



**Catarina Micaela**  
**Pires Antunes Rebelo**

**Nanogéis Compósitos de Ouro para Libertação**  
**Controlada de Fármacos por Ação de Radiação**





**Universidade de Aveiro** Departamento de Química  
2014

**Catarina Micaela  
Pires Antunes Rebelo**

**Nanogéis Compósitos de Ouro para Libertação  
Controlada de Fármacos por Ação de Radiação**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química, realizada sob a orientação científica da Doutora Ana Luísa Daniel da Silva, Investigadora Auxiliar do Centro de Investigação em Materiais Cerâmicos e Compósitos (CICECO) da Universidade de Aveiro



Dedico este trabalho ao meu avô, que apesar da mudança de rumo na minha vida acadêmica iria ficar igualmente orgulhoso, aos meus pais e irmão.



## **o júri**

presidente

**Professor Doutor Carlos Manuel Santos da Silva**

professor auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

**Doutor Gil Alberto Batista Gonçalves**

investigador de pós-doutoramento do Departamento de Engenharia Mecânica da Universidade de Aveiro

**Doutora Ana Luísa Daniel da Silva**

investigadora auxiliar do Centro de Investigação em Materiais Cerâmicos e Compósitos (CICECO) da Universidade de Aveiro





## **agradecimentos**

Gostaria de agradecer à minha orientadora, a Doutora Ana Luísa Daniel da Silva, pela dedicação, otimismo e incansável apoio prestado ao longo destes meses.

Ao Professor Tito Trindade pela integração no grupo de trabalho e ao Professor Sushil Mendiratta pela ajuda com os ensaios de libertação através da disponibilização do laser e do seu laboratório.

Agradeço à Mestre Celeste Azevedo pelo auxílio com os equipamentos de espectroscopia e pelas análises térmicas dos nanogéis. Agradeço ainda à Doutora Ana Violeta Girão pelas imagens de microscopia eletrónica e incentivos diários. À Doutora Ana Cristina Estrada pela análise das nanopartículas de ouro por difração de raios-X e ao Nuno Almeida pela disponibilização do liofilizador.

Agradeço também aos colegas do Nanolab, em particular à Joana Lopes pela amizade e boa disposição quotidiana, à Eliana e à Filipa por todos os ensinamentos, orientação, carinho e amizade, aos Ruis, à Sónia, à Sofia e à Paula pela elucidação das minhas dúvidas óbvias, ajuda, sugestões, disponibilidade e gargalhadas no convívio do dia-a-dia que conferiram alguma leveza a este percurso.

À Ana pela amizade, sarcasmo revitalizante e motivação com que sempre me brindou ao longo do processo.

À Rita pela amizade incondicional, coragem transmitida, risada espontânea em todos os momentos, pela generosidade e bondade que sempre me ajudaram e me mantiveram sã nesta viagem.

Ao Ricardo pela paciência imensa, apoio constante, cumplicidade, afeto infinito e total atenção que me permitiram continuar nos momentos mais difíceis.

Por último mas o mais importante, aos meus pais e irmão por serem quem são, pela força imensurável, carinho e sacrifícios pelos quais passaram e que me permitiram chegar até aqui como uma pessoa melhor, mais forte e independente.



## palavras-chave

Nanoprismas de ouro,  $\kappa$ -carragenano, alginato, quitosano, liberação controlada, azul-de-metileno, radiação NIR.

## resumo

Neste trabalho sintetizaram-se e caracterizaram-se nanoprismas triangulares de ouro sem utilização de tensioativos usando como estabilizantes o  $\kappa$ -carragenano e o alginato. De seguida sintetizaram-se dois nanogéis termossensíveis por complexação polieletrólítica dos biopolímeros  $\kappa$ -carragenano e alginato com quitosano. Nos nanogéis compósitos dispersaram-se os nanoprismas de ouro previamente preparados.

Estudou-se o efeito dos nanoprismas de ouro nas propriedades óticas e térmicas dos nanogéis compósitos preparados. Os compósitos sintetizados apresentavam as propriedades óticas dos nanoprismas de ouro incorporados. Nos dois sistemas, a adição dos nanoprismas contribui para a diminuição das temperaturas de transição gel-sol para o intervalo entre 37-45°C, tornando-os mais adequados à liberação controlada de fármacos.

Realizaram-se ensaios de exposição das nanopartículas de ouro, estabilizadas em  $\kappa$ -carragenano e alginato, a radiação NIR utilizando um laser de 785nm de comprimento de onda. Estes ensaios mostraram que as nanopartículas preparadas podem ser utilizadas na indução de aquecimento localizado quando expostos a este tipo de radiação devido ao efeito fototérmico.

Finalmente, procedeu-se à realização de ensaios de liberação do azul-de-metileno a partir dos nanogéis de  $\kappa$ -carragenano/quitosano à temperatura fisiológica, com e sem a ação de radiação como estímulo externo. Verificou-se que, sob a ação de radiação NIR, a liberação é tanto maior quanto mais elevado é o teor de nanoprismas de ouro nos nanogéis compósitos. Posteriormente estudou-se a cinética de liberação através de equações/modelos descritos na literatura, como as equações de cinética de ordens 0 e 1 e os modelos de Korsmeyer-Peppas e Higuchi. Os perfis de liberação obtidos demonstram que, de um modo geral, o modelo de Korsmeyer-Peppas e a equação de cinética de ordem 1 se ajustam bem aos resultados experimentais permitindo concluir acerca dos mecanismos de liberação associados.



**keywords**

Gold nanoprisms,  $\kappa$ -carrageenan, alginate, chitosan, controlled release, methylene blue, NIR radiation.

**abstract**

In this work gold triangular nanoprisms, without the use of surfactants using  $\kappa$ -carrageenan and alginate as stabilizers, were prepared and characterized. Then two thermosensitive nanogels were prepared and characterized by polyelectrolyte complexation of  $\kappa$ -carrageenan and alginate with chitosan. In the composite nanogels the gold nanoprisms previously prepared were dispersed. The effect of gold nanoprisms in the optical and thermal properties of composite nanogels was studied. The synthesized composites showed the optical properties of incorporated gold nanoprisms. In both systems, the addition of nanoprisms contributes to the decrease of the gel-sol transition temperatures into the 37-45°C range, making them more suitable for controlled drug release. The exposure of gold nanoparticles, stabilized in  $\kappa$ -carrageenan and alginate, to NIR radiation of a 785 nm laser was investigated. These studies revealed that the gold nanoparticles can be used to induce localized heating when exposed to this kind of radiation due to the photothermal effect. Finally, release experiments of a methylene blue from  $\kappa$ -carrageenan/chitosan nanogels were carried out at physiological temperature and with and without the action of NIR radiation as external stimulus. It was found that, upon the action of NIR radiation, the release is greater as the content of gold nanoprisms in the composite nanogels increases. Subsequently the release kinetics was studied using some equations/models described in the literature, as the kinetic equations of orders 0 and 1 as well as the Korsmeyer-Peppas and Higuchi models. The obtained methylene blue release profiles demonstrate that, overall, the Korsmeyer-Peppas model and the zero-order kinetic equation fit well to the experimental data and allow to conclude about the release mechanisms associated.



# Índice

Índice de Figuras .....	v
Índice de Tabelas.....	ix
Lista de Siglas, Símbolos e Abreviaturas.....	xi
1. Enquadramento e Objetivos .....	1
2. Revisão Bibliográfica.....	3
2.1. Libertação Controlada de Fármacos.....	3
2.1.1. Importância e Necessidade de Sistemas de Libertação Controlada de Fármacos .....	3
2.1.2. Sistemas de Libertação Controlada de Fármacos.....	4
2.1.3. Hidrogéis e a Libertação Controlada de Fármacos .....	6
2.2. Hidrogéis .....	7
2.2.1. Classificação e Principais Propriedades.....	7
2.2.2. Hidrogéis Sensíveis a Estímulos Externos .....	8
2.2.2.1. Hidrogéis Sensíveis à Temperatura .....	9
κ-carragenano.....	9
2.2.2.2. Hidrogéis Sensíveis ao pH.....	11
Alginato .....	11
Quitosano .....	12
2.2.2.3. Hidrogéis Sensíveis a Radiação.....	13
2.2.3. Hidrogéis Nanocompósitos para Libertação de Fármacos .....	14
2.2.4. Nanogéis .....	15
2.3. Nanopartículas de Ouro.....	16
2.3.1. Propriedades Óticas .....	16
2.3.2. Efeito Fototérmico .....	18
2.3.3. Aplicações na Biomedicina .....	19
2.3.3.1. Diagnóstico.....	20
2.3.3.2. Imagiologia.....	20
2.3.3.3. Terapia.....	20
Libertação de Fármacos .....	20

Termoterapias .....	21
2.4. Azul-de-metileno.....	22
2.5. Modelos Cinéticos para Liberação de Fármacos.....	23
2.5.1. Equações de Cinética .....	24
2.5.1.1. Ordem Zero .....	24
2.5.1.2. Ordem Um.....	24
2.5.2. Modelos Cinéticos .....	25
2.5.2.1. Korsmeyer-Peppas.....	25
2.5.2.2. Higuchi .....	26
3. Materiais e Métodos .....	27
3.1. Reagentes .....	27
3.2. Preparação das Nanopartículas de Ouro estabilizadas em Biopolímero .....	27
3.2.1. $\kappa$ -carragenano .....	27
3.2.2. Alginato .....	27
3.3. Preparação de Nanogéis .....	28
3.3.1. Nanogéis de $\kappa$ -carragenano/Quitano .....	28
3.3.1.1. Sem Nanopartículas de Au .....	28
3.3.1.2. Com Nanopartículas de Au .....	28
3.3.2. Nanogéis de Alginato/Quitano .....	28
3.3.2.1. Sem Nanopartículas de Au .....	28
3.3.2.2. Com Nanopartículas de Au .....	29
3.4. Avaliação do Efeito Fototérmico .....	29
3.4.1. AuNPs estabilizadas em $\kappa$ -carragenano e Alginato .....	29
3.5. Ensaios de Encapsulação.....	30
3.6. Ensaios de Liberação.....	30
3.6.1. Sem Exposição a Radiação NIR .....	30
3.6.2. Com Exposição a Radiação NIR.....	30
3.7. Instrumentação .....	31
4. Resultados Experimentais e Discussão .....	33
4.1. Preparação de Nanoprismas de Ouro .....	33
4.1.1. Nanoprismas de Ouro estabilizados em $\kappa$ -carragenano .....	34



4.1.1.1. Propriedades Óticas .....	34
4.1.1.2. Composição Química .....	36
Espectroscopia de IV .....	36
Difração de Raios-X (DRX) .....	37
4.1.1.3. Morfologia e Carga Superficial .....	37
Microscopia Eletrônica .....	37
Diâmetro Hidrodinâmico (DLS) e Potencial Zeta ( $\zeta$ ) .....	38
4.1.2. Nanoprismas de Ouro estabilizados em Alginato .....	38
4.1.2.1. Propriedades Óticas .....	38
4.1.2.2. Composição Química .....	40
Espectroscopia de IV .....	40
4.1.2.3. Morfologia e Carga Superficial .....	40
Microscopia Eletrônica .....	40
Diâmetro Hidrodinâmico (DLS) e Potencial Zeta ( $\zeta$ ) .....	41
4.2. Preparação de Nanogéis Compósitos de Ouro .....	41
4.2.1. Nanogéis de $\kappa$ -carragenano/Quitossano contendo Nanoprismas de Ouro .....	41
4.2.1.1. Morfologia e Carga Superficial .....	41
4.2.1.1.1. Microscopia Eletrônica .....	41
Diâmetro Hidrodinâmico e Potencial Zeta .....	43
4.2.1.2. Propriedades Óticas .....	44
4.2.1.3. Composição Química .....	45
Espectroscopia de IV .....	45
4.2.1.4. Propriedades Térmicas .....	46
DSC .....	46
4.2.2. Nanogéis de Alginato/Quitossano contendo Nanoprismas de Ouro .....	47
4.2.2.1. Morfologia e Carga Superficial .....	47
Microscopia Eletrônica .....	47
Diâmetro Hidrodinâmico e Potencial Zeta .....	47
4.2.2.2. Propriedades Óticas .....	48
4.2.2.3. Composição Química .....	49

Espectroscopia de IV .....	49
4.2.2.4. Propriedades Térmicas .....	50
DSC.....	50
4.3. Avaliação do Efeito Fototérmico .....	50
4.3.1. Nanoprismas de Ouro estabilizados em $\kappa$ -carragenano .....	51
4.3.2. Nanoprismas de Ouro estabilizados em Alginato .....	52
4.4. Ensaios de Encapsulação.....	52
4.5. Ensaios de Libertação Controlada de AM.....	53
4.5.1. Sem Exposição a Radiação NIR .....	53
4.5.2. Com Exposição a Radiação NIR.....	54
4.6. Modelação da Cinética de Libertação .....	56
5. Conclusões e Perspetivas de Trabalho Futuro.....	59
6. Bibliografia .....	61
7. Anexos.....	65
1. Microscopia Eletrónica dos nanoprismas de ouro após armazenamento .....	65
2. Ficha DRX do ouro .....	66
3. Morfologia e Carga Superficial.....	67
4. Avaliação do Efeito Fototérmico .....	69
5. Reta de Calibração do Azul-de-metileno .....	72
6. Ensaios de Encapsulação.....	73
7. Ensaios de Libertação.....	73
8. Modelação da Cinética de Libertação .....	75
1. Ensaios sem radiação @37°C.....	75
2. Ensaios com radiação.....	77

## Índice de Figuras

Figura 1 - Efeito da concentração de medicamento no organismo recorrendo a diferentes métodos de administração. [adaptado de [10]] .....	3
Figura 2 – Exemplos de nanopartículas estudadas para a libertação de fármacos. [adaptado de [13]] .....	4
Figura 3 - Tipos de estímulos responsáveis pelo intumescimento dos hidrogéis. [adaptado de [17]] .....	8
Figura 4 - Polímeros termossensíveis e a libertação de fármacos. [adaptado de [10]] .....	9
Figura 5 - Estrutura química da unidade dissacarídea do $\kappa$ -carragenano. [7] .....	10
Figura 6 - Mecanismo de gelificação do $\kappa$ -carragenano. [adaptado de [21]] .....	10
Figura 7 - Estrutura química (esquerda) e estrutura molecular (direita) do alginato . [7] [10] .....	11
Figura 8 - Gelificação do alginato por interação com iões $\text{Ca}^{2+}$ . [21] .....	12
Figura 9 – Estrutura química do quitosano. [7] .....	13
Figura 10 - Diferentes formas de hidrogéis nanocompósitos. [Adaptado de [40]] .....	15
Figura 11 - Oscilações plasmónicas induzidas pelo campo elétrico no modo transversal e longitudinal (A); espectro de absorção de nanoprismas de ouro onde se mostra a contribuição do modo de ressonância no plano e representação dos modos dipolar e quadripolar dos nanoprismas de ouro. [adaptado de [47]] .	17
Figura 12 – Propriedades óticas de algumas nanopartículas de ouro. [adaptado de [45]] .....	17
Figura 13 - Morfologias e dimensões de nanopartículas metálicas. [Adaptado de [47], [48]] .....	18
Figura 14 - Propriedades óticas de alguns componentes dos tecidos. [adaptado de [45]] .....	19
Figura 15 – Espectro Vis-NIR de nanoprismas triangulares e nanodiscos de ouro mostrando a localização da banda SPR na região do NIR. [9] .....	19
Figura 16 - Aplicações das nanopartículas de ouro na biomedicina. [adaptado de [38]] .....	20
Figura 17 – Estrutura do azul-de-metileno. [64] .....	23
Figura 18-Esquema representativo da célula de aquecimento. ....	29
Figura 19 - Representação esquemática das etapas da síntese dos nanoprismas triangulares de ouro. ....	33
Figura 20 - Espectros de absorção Vis-NIR de suspensões de AuNPs obtidas variando a concentração do agente redutor ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) após aproximadamente 1h de reação. ....	34
Figura 21 – Monitorização da banda de plasmão da solução de nanopartículas de ouro por espectroscopia VIS-NIR antes e após a adição de $\kappa$ -carragenano. Os espectros apresentados para $t = 15$ e $30$ min correspondem ao coloide após 15 minutos e 30 min da 2ª adição de agente redutor, os $t = 45$ e $60$ min correspondem aos momentos antes e após a adição de biopolímero, e por último $t = 75$ min é o momento após a centrifugação e redispersão do coloide. ....	34
Figura 22 – Espectros de absorção UV-Vis-NIR de monitorização da estabilidade da dispersão de nanopartículas de ouro em $\kappa$ -carragenano. ....	35

Figura 23 – Espectros de absorção UV-Vis-NIR de monitorização da estabilidade da dispersão de nanopartículas de ouro em $\kappa$ -carragenano normalizados. ....	36
Figura 24 - Espectros de IV (em modo de absorvância) do $\kappa$ -CRG e das AuNPs em $\kappa$ -CRG. ....	36
Figura 25 - Difratoograma de raios-X das nanopartículas de ouro estabilizadas em $\kappa$ -carragenano. ....	37
Figura 26.A e B – Imagens de STEM dos nanoprismas e nanoesferas de ouro presentes na amostra. ....	37
Figura 27 - Espectros de absorção UV-Vis-NIR de monitorização da estabilidade da dispersão de nanopartículas de ouro em alginato. ....	39
Figura 28 - Espectros de absorção UV-Vis-NIR de monitorização da estabilidade da dispersão de nanopartículas de ouro em alginato normalizados. ....	39
Figura 29 - Espectros de IV (em modo de absorvância) do ALG e das AuNPs em ALG. ....	40
Figura 30 – Imagens de TEM dos nanoprismas de ouro da amostra em alginato. ....	40
Figura 31 - Mecanismo proposto para a formação de nanogéis por complexação polieletrólítica. [Adaptado de [79]].....	41
Figura 32 – Imagens de SEM (A) e STEM (B) do nanogel de $\kappa$ -CRG/QUT sem AuNPs. ....	42
Figura 33 – Imagens de SEM (A) e STEM (B) da amostra de nanogel com menos AuNPs, $\kappa$ -CRG/QUT/Au1. ....	42
Figura 34 – Imagens de SEM (A e B) e STEM (C) do nanogel com mais AuNPs, $\kappa$ -CRG/QUT/Au2.....	42
Figura 35 - Espectros Vis-NIR dos coloides dos nanogéis de $\kappa$ -CRG/QUT/Au e do coloide de nanoprismas de Au usados nestas sínteses. ....	44
Figura 36- Espectros de IV (em modo de absorvância) dos nanogéis de $\kappa$ -CRG/QUT, de $\kappa$ -CRG/QUT/Au, de $\kappa$ -CRG e de QUT. ....	45
Figura 37 - Termogramas de DSC dos nanogéis de $\kappa$ -CRG/QUT com e sem AuNPs. ....	46
Figura 38 – Imagens de STEM (A) e SEM (B) do nanogel de ALG/QUT sem AuNPs.....	47
Figura 39 - Imagens de STEM (A) e SEM (B) do nanogel de ALG/QUT com AuNPs.....	47
Figura 40 - Espectros Vis-NIR dos nanogéis de ALG/QUT, ALG/QUT/Au e do coloide de nanoprismas de Au usados nestas sínteses. ....	48
Figura 41 - Espectros de IV dos nanogéis de ALG/QUT, de ALG/QUT/Au, de ALG e de QUT. ....	49
Figura 42 - Termogramas de DSC dos nanogéis de ALG/QUT com e sem AuNPs. ....	50
Figura 43 - Monitorização da temperatura de coloides de AuNPs estabilizadas em $\kappa$ -carragenano de diferentes concentrações ao longo do tempo de exposição a radiação NIR. ....	51
Figura 44 - Monitorização da temperatura de coloides de AuNPs estabilizadas em alginato de diferentes concentrações ao longo do tempo de exposição a radiação NIR. ....	52
Figura 45 – Curva cumulativa de libertação do AM a partir de nanogéis de $\kappa$ -carragenano/quitosano sem e com AuNPs sem exposição a radiação NIR. ....	54

Figura 46 - Curva cumulativa de libertação do AM a partir de nanogéis de $\kappa$ -carragenano/quitosano sem e com AuNPs com exposição a radiação NIR. ....	55
Figura 47 – Comparação das curvas de cinética de libertação do AM a partir dos nanogéis $\kappa$ -CRG/QUT/Au 2 sem e com o efeito do laser.....	55
Figura 48 - Imagens de STEM dos nanoprismas de ouro em $\kappa$ -carragenano com alteração de morfologia. ....	65
Figura 49 – Imagens de STEM dos nanoprismas de ouro em alginato com alteração de morfologia. ....	65
Figura 50 - Histograma da distribuição de comprimentos das arestas dos nanoprismas de ouro em $\kappa$ -carragenano.....	67
Figura 51 - Histograma da distribuição de diâmetros das nanoesferas de ouro em $\kappa$ -carragenano. ....	67
Figura 52 - Histograma da distribuição de comprimentos das arestas dos nanoprismas de ouro em alginato. ....	67
Figura 53 – Histograma da distribuição dos diâmetros das nanopartículas esféricas de ouro em alginato. ..	67
Figura 54 – 1) Distribuição do diâmetro hidrodinâmico obtido por DLS da solução de 0,5 mg/mL de $\kappa$ -CRG (A), da solução de 1 mg/mL de QUT em ácido acético a 1% (v/v) (B) e do nanogel de $\kappa$ -CRG/QUT (C); 2) Distribuição do diâmetro hidrodinâmico obtido por DLS da solução de 0,063 % (m/m) de ALG (A), da solução aquosa de 0,70 mg/mL de QUT (B), do nanogel de ALG/QUT (C) e do nanogel de ALG/QUT com AuNPs (D). ....	68
Figura 55 - Reta de calibração usada nos ensaios de encapsulação de AM.....	72
Figura 56 - Reta de calibração usada nos ensaios de libertação de AM. ....	72
Figura 57 – Representações dos ajustes dos dados experimentais de libertação dos nanogéis $\kappa$ -CRG/QUT sem exposição a radiação a 37°C. Onde em (a) foram utilizados todos os pontos experimentais e em (b) se excluíram os pontos t = 0 e 240 min. ....	75
Figura 58 - Representações gráficas dos ajustes dos dados experimentais de libertação dos nanogéis com AuNPs sem exposição a radiação a 37°C. Onde em (a) foram utilizados todos os pontos experimentais e em (b) se excluíram os pontos t = 0 e 240 min. ....	76
Figura 59 - Representações gráficas dos ajustes dos dados experimentais de libertação dos nanogéis sem AuNPs com exposição a radiação. Onde em (a) foram utilizados todos os pontos experimentais e em (b) se excluiu o ponto t = 0 min.....	78
Figura 60 - Representações gráficas dos ajustes dos dados experimentais de libertação dos nanogéis compósitos 1 com exposição a radiação. Onde em (a) foram utilizados todos os pontos experimentais e em (b) se excluíram os pontos t = 0 e 240 min. ....	78
Figura 61 - Representações gráficas dos ajustes dos dados experimentais de libertação dos nanogéis compósitos 2 com exposição a radiação. Onde em (a) foram utilizados todos os pontos experimentais e em (b) se excluiu o ponto t = 0 min. ....	79
Figura 62 - Representações gráficas dos ajustes dos dados experimentais de libertação dos nanogéis compósitos 2 a temperatura ambiente. Onde em (a) foram utilizados todos os pontos experimentais e em (b) se excluiu o ponto t = 0 min.....	80



## Índice de Tabelas

Tabela 1 - Vantagens e desvantagens de dispositivos de liberação de fármacos. [adaptado de [10]] .....	4
Tabela 2 - Dimensões típicas das diferentes nanopartículas de ouro. [Adaptado de [47], [48]].....	18
Tabela 3 - Nanopartículas metálicas usados na terapia térmica do cancro. [Adaptado de [54]–[58]] .....	21
Tabela 4 - Expoente de liberação $n$ do modelo e mecanismos de liberação de acordo com a geometria do sistema de liberação controlada de fármaco (adaptado de [6], [66], [67], [71]) .....	26
Tabela 5 – Potencial zeta e diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas de ouro estabilizadas em $\kappa$ -carragenano. ....	38
Tabela 6 – Potencial zeta e diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas de ouro estabilizadas em alginato... ..	41
Tabela 7 – Potencial zeta e diâmetro hidrodinâmico dos nanogéis de $\kappa$ -CRG/QUT sem e com AuNPs. ....	43
Tabela 8 – Potencial zeta e diâmetro hidrodinâmico dos nanogéis de ALG/QUT sem e com AuNPs. ....	48
Tabela 9 – Resultados dos ensaios de encapsulação de AM prévios aos ensaios de liberação. ....	53
Tabela 10 – Parâmetros cinéticos e coeficiente de determinação obtidos na modelação cinética dos dados de liberação dos nanogéis de $\kappa$ -CRG/QUT sem e com efeito de radiação. ....	56
Tabela 11 – Potencial zeta e diâmetro hidrodinâmico das soluções usadas nas sínteses de AuNPs.....	67
Tabela 12 - Potencial zeta e diâmetro hidrodinâmico das soluções usadas nas sínteses de nanogéis de $\kappa$ -CRG/QUT e ALG/QUT. ....	68
Tabela 13 – Resultados obtidos para a água UP.....	69
Tabela 14 – Resultados obtidos das amostras de AuNPs estabilizadas em $\kappa$ -carragenano.....	69
Tabela 15 – Resumo dos resultados obtidos das amostras de AuNPs estabilizadas em $\kappa$ -carragenano. ....	70
Tabela 16 - Resultados obtidos das amostras de AuNPs estabilizadas em alginato. ....	70
Tabela 17 – Resumo dos resultados obtidos das amostras de AuNPs estabilizadas em alginato. ....	71
Tabela 18 – Resultados obtidos nos ensaios de encapsulação de AM prévios aos ensaios de liberação. ....	73
Tabela 19 – Resultados da liberação de AM dos nanogéis sem AuNPs no ensaio sem exposição a radiação com temperatura constante de 37°C.....	73
Tabela 20 - Resultados da liberação de AM dos nanogéis com AuNPs no ensaio sem exposição a radiação com temperatura constante de 37°C.....	73
Tabela 21 - Resultados da liberação de AM dos nanogéis no ensaio com exposição a radiação. ....	74
Tabela 22 - Resultados da liberação de AM dos nanogéis compósitos 2 no ensaio sem exposição a radiação e a temperatura ambiente. ....	74

Tabela 23 – Modelação cinética dos dados de libertação de AM dos nanogéis $\kappa$ -CRG/QUT sem efeito de radiação.....	75
Tabela 24 – Modelação cinética dos dados de libertação de AM dos nanogéis de $\kappa$ -CRG/QUT/Au sem efeito de radiação.....	76
Tabela 25 – Modelação cinética dos dados de libertação de AM dos nanogéis com efeito de radiação. ....	77
Tabela 26 – Modelação cinética dos dados de libertação de AM dos nanogéis de $\kappa$ -CRG/QUT/Au <sub>2</sub> sem efeito de radiação a temperatura ambiente.....	79



## Lista de Siglas, Símbolos e Abreviaturas

### *Siglas e Abreviaturas*

Abs – Absorvância

ALG - Alginato

AM – Azul-de-metileno

AuNPs – Nanopartículas de ouro

CST – Temperatura de Solução Crítica (do inglês *Critical Solution Temperature*)

CTAB – Brometo de Cetiltrimetilamônio

DLS – Dispersão Dinâmica de Luz (do inglês *Dynamic Light Scattering*)

DP – Desvio-padrão

DRX – Difração de raios-X

DSC – Calorimetria diferencial de varrimento (do inglês *Differential Scanning Calorimetry*)

EPR – Efeito do aumento da permeabilidade e retenção

FTIR - Espectroscopia de infravermelhos com transformadas de Fourier

IV – Infra-vermelho

KP – Modelo de Korsmeyer-Peppas

LCST – Temperatura de Solução Crítica Inferior (do inglês *Low Critical Solution Temperature*)

NIR – Infra-vermelho próximo (do inglês *Near Infrared*)

NPs - Nanopartículas

PBS – Solução tampão de fosfato salina (do inglês *Phosphate Buffered Saline*)

Pdi – Índice de polidispersividade

QUT – Quitosano

STEM – Microscopia Eletrônica de Varrimento em modo de Transmissão (do inglês *Scanning Transmission Electron Microscopy*)

T<sub>amb</sub> – Temperatura ambiente

TEM – Microscopia Eletrônica de Transmissão (do inglês *Transmission Electron Microscopy*)

UCST – Temperatura de Solução Crítica Elevada (do inglês *Upper Critical Solution Temperature*)

UP - Ultrapura

UV-Vis – Ultravioleta-visível

UV-Vis-NIR - Ultravioleta-visível-perto da região de infra-vermelho

Vis-NIR – Visível-perto da região de infra-vermelho

$\kappa$ -CRG –  $\kappa$ -carragenano

### ***Símbolos***

$C_{AM}$  – Concentração de azul-de-metileno

CE – Capacidade de encapsulação

$C_i$  – Concentração mássica de AM (por mL) da alíquota

$C_n$  – Concentração mássica de AM (por mL) da alíquota no momento t

d – Diâmetro hidrodinâmico em número das nanopartículas

EE – Eficiência de encapsulação

k – Constante cinética

$m_0$  – Massa de azul-de-metileno encapsulada nos nanogéis

$m_{DI}$  – Massa inicial de azul-de-metileno presente em solução

$m_{DN}$  – Massa de azul-de-metileno encapsulada nos nanogéis

$m_{DSP}$  – Massa de azul-de-metileno presente no sobrenadante após a encapsulação

$m_N$  – Massa inicial dos nanogéis liofilizados

$m_t$  – Massa de azul-de-metileno libertado no instante t

n – Coeficiente/Expoente de libertação

$R^2$  – Coeficiente de determinação

t – Tempo

T – Temperatura

$V_{ML}$  – Volume do meio de libertação

$\Delta T$  – Incremento de Temperatura

$\zeta$  – Potencial Zeta

$\lambda$  – Comprimento de onda

## 1. Enquadramento e Objetivos

A nanotecnologia é a ciência envolvida no desenvolvimento, caracterização e aplicação de dispositivos e materiais à escala nanométrica. Nos últimos anos, esta área científica multidisciplinar tem vindo a crescer e a influenciar diversos aspetos da ciência e tecnologia permitindo avanços significativos em áreas como biologia, química e física mas, sobretudo no que diz respeito à área da medicina. [1]–[3] Os materiais e dispositivos à escala nanométrica podem desempenhar um papel de extrema importância na medicina, onde impulsionaram a melhoria de várias técnicas de diagnóstico, libertação controlada de substâncias ativas em locais específicos do organismo e terapias para diversas doenças. Desta forma o uso da nanotecnologia permite diagnósticos mais precisos e precoces, bem como tratamentos médicos personalizados, inovadores e eficazes contribuindo para o bem-estar dos pacientes. [2], [3]

A indústria farmacêutica tem vindo a beneficiar imenso com o desenvolvimento desta área visto que com esta abordagem se têm vindo a colmatar algumas falhas dos sistemas de libertação controlada de fármacos convencionais. De facto pretende-se que a administração dos agentes terapêuticos seja mais fácil e menos frequente, personalizada de acordo com as necessidades de cada paciente e direcionada apenas às células, tecidos ou órgãos alvo evitando desta forma sobredosagens, desconforto e efeitos secundários. [3], [4] Neste contexto surge o interesse em sistemas de libertação controlada de fármacos que compreendam todas as vantagens e características referidas anteriormente aliadas à possibilidade de ativar e controlar a libertação das substâncias encapsuladas remotamente por ação de um estímulo externo como variação da temperatura ou aplicação de campo magnético ou radiação, entre outros. Estes nanossistemas continuam em constante desenvolvimento, uma das possibilidades passa pela utilização de polímeros naturais como matriz para a dispersão de nanopartículas metálicas. As nanopartículas podem induzir propriedades magnéticas ou óticas ao sistema enquanto a presença de polímeros naturais permite aumentar a biocompatibilidade do sistema. Estes componentes têm sido bastante usados quer devido à sua biocompatibilidade e reduzida toxicidade quer devido às extraordinárias propriedades óticas e térmicas que exibem. [5]–[8] No entanto, a preparação destes materiais envolve frequentemente o uso de tensioativos, como o brometo de cetiltrimetilamónio (CTAB), que devido à sua toxicidade e dificuldade de remoção comprometem a aplicação destes sistemas em aplicações biomédicas. [9]

O principal objetivo deste trabalho é o desenvolvimento de nanopartículas de hidrogéis (também designados de nanogéis) compósitas de ouro, para aplicação na libertação controlada de fármacos por ação de radiação do infravermelho próximo como estímulo externo. Os nanogéis compósitos foram preparados sem recorrer ao uso de tensioativos envolvendo a complexação de biopolímeros por interações eletroestáticas. Concretamente foram preparados dois sistemas de origem natural termossensíveis como matrizes poliméricas, alginato/quitosano e  $\kappa$ -carragenano/quitosano, onde foram incorporados nanoprismas de ouro como fase dispersa. Durante o decurso do trabalho foram também sintetizadas nanopartículas de ouro com morfologia adequada para a preparação e caracterização dos nanogéis compósitos. Por fim foram efetuados estudos de libertação controlada de uma substância encapsulada à temperatura fisiológica, com e sem a ação da radiação como estímulo externo, estudando-se a sua cinética de libertação através de modelos descritos na literatura.



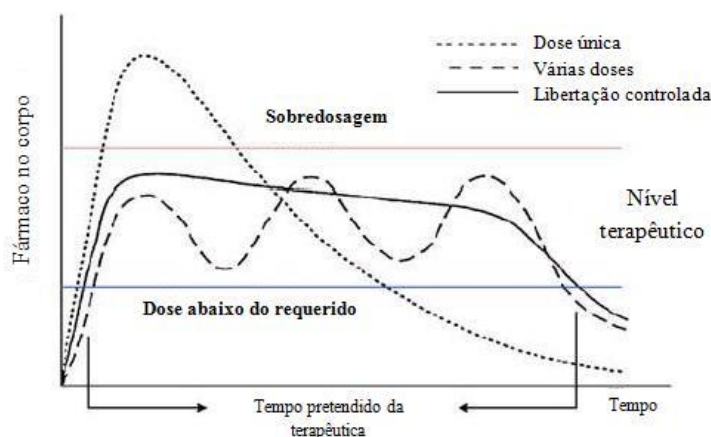
## 2. Revisão Bibliográfica

### 2.1. Liberação Controlada de Fármacos

#### 2.1.1. Importância e Necessidade de Sistemas de Liberação Controlada de Fármacos

Com o decorrer do tempo, a indústria farmacêutica tem vindo a evoluir rapidamente no desenvolvimento de novos conceitos de forma a melhorar o bem-estar do ser humano. Embora a população mundial tenha atualmente maior longevidade devido aos avanços da medicina, por outro lado tem vindo a ficar cada vez mais vulnerável, sobretudo devido ao desenvolvimento de resistência por parte do organismo a alguns fármacos o que leva a uma toma de medicamentos cada vez mais frequente e em maior dosagem. [10]

Os sistemas de liberação controlada de fármacos nasceram da necessidade de manter os níveis dos medicamentos adequados ao organismo dos pacientes de acordo com as indicações terapêuticas. [10] A evolução tecnológica tem permitido que os sistemas de liberação controlada de fármacos evoluam de forma a ultrapassar algumas limitações observadas nos meios convencionais de administração de fármacos. Com a evolução da ciência e dos fármacos verificou-se que a administração destes podia ser otimizada. Os principais desafios passam pela determinação da concentração certa administrada, o período de tempo de administração e a seletividade do medicamento. De modo a que o tratamento seja eficaz é necessário manter os níveis da substância administrada dentro da gama de concentração adequada às necessidades de cada paciente, evitando a toxicidade por sobredosagem ou a ineficiência do tratamento. Na figura 1 podem observar-se os efeitos da concentração de medicamento no organismo quando este é administrado por diferentes métodos. [4], [10]



**Figura 1 - Efeito da concentração de medicamento no organismo recorrendo a diferentes métodos de administração. [adaptado de [10]]**

Com vista a diminuir o desconforto dos pacientes e aumentar a eficácia dos tratamentos e reduzir eventuais efeitos secundários torna-se importante recorrer a sistemas de administração controlada de fármacos, de modo seletivo, ou seja, atuando apenas no órgão ou tecido afetado. Na tabela 1 apresentam-se as principais vantagens e desvantagens dos dispositivos de liberação controlada de fármacos. [10]

**Tabela 1 - Vantagens e desvantagens de dispositivos de liberação de fármacos. [adaptado de [10]]****Vantagens dos Dispositivos de Liberação de Fármacos**

Extensão da duração de ação e biodisponibilidade do fármaco  
 Minimização da degradação e perda de fármaco  
 Prevenção de efeitos colaterais adversos do fármaco  
 Redução da frequência de administração  
 Minimização das flutuações de concentração de fármaco no plasma  
 Melhoria da utilização de fármacos  
 Melhoria do cumprimento da terapêutica prescrita

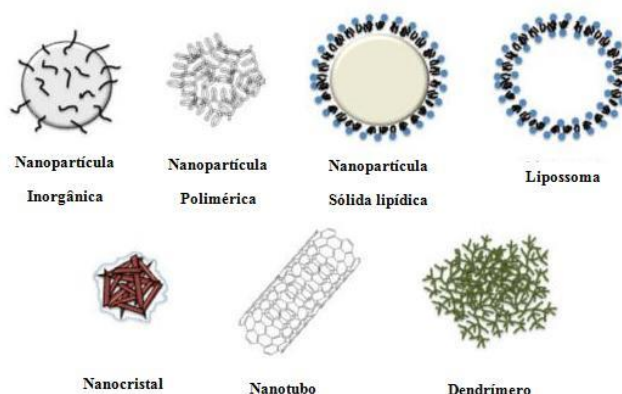
**Desvantagens dos Dispositivos de Liberação de Fármacos**

Possibilidade de toxicidade por parte dos materiais  
 Degradação originando produtos nocivos  
 Necessidade de intervenção cirúrgica tanto na aplicação como na remoção destes sistemas  
 Desconforto dos pacientes durante o uso dos dispositivos  
 Custo de produto final elevado

Nos últimos anos têm-se concentrado esforços no desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos que possam ser injetados ou implantados no corpo dos pacientes e que, através de um dispositivo de controlo remoto, possam ser ativados pelo próprio paciente ou por um operador. Idealmente estes dispositivos seriam tão autónomos ao ponto de se poder determinar a hora, duração, dosagem e até o local de liberação desejado através da ativação remota não invasiva, o que permitiria a alteração do fluxo de agente terapêutico de acordo com as necessidades do tratamento. [4]

**2.1.2. Sistemas de Liberação Controlada de Fármacos**

Os nanovetores são sistemas à escala nanométrica que têm a capacidade de transportar consigo múltiplas substâncias como fármacos e/ou agentes de imagem. As características de cada uma destas partículas influenciam a capacidade de carga de fármaco, estabilidade da partícula e do fármaco assim como a velocidade de liberação do mesmo. [11], [12] Na figura 2 podem observar-se alguns dos tipos de nanopartículas usados na liberação de fármacos.

**Figura 2 – Exemplos de nanopartículas estudadas para a liberação de fármacos. [adaptado de [13]]**

Os dendrímeros são estruturas bastante atrativas para a liberação de fármacos, uma vez que possuem no seu interior uma estrutura esférica simétrica, que permite encapsular moléculas dentro da sua estrutura. Para além disso permite a modificação química através da sintetização ou conjugação do fármaco através da

formação de ligações biodegradáveis.[11]–[14] As principais desvantagens são os custos elevados associados à sua produção, síntese complexa e o controlo adequado da libertação da substância encapsulada. [12]

O interesse da aplicação dos nanotubos de carbono estende-se desde a biologia à medicina. Enquanto na biologia estes podem ser usados como sensores para deteção de ADN e proteínas, na medicina são estudados para aplicação como dispositivos de diagnóstico para diferenciação de proteínas presentes em amostras de soro e como transportadores de fármacos, como vacinas ou proteínas. [12]

Os *quantum dots* desempenham um papel importantíssimo na imagiologia molecular e celular devido ao seu elevado rendimento quântico de fluorescência, resistência à fotodegradação e às suas propriedades físicas, químicas e óticas únicas. [13], [15], [16]

Os lipossomas e as micelas, como a maioria das nanopartículas, beneficiam do efeito de aumento da permeabilidade e retenção dos tecidos (EPR) e têm baixa toxicidade. No entanto, ambos carecem de mecanismos de libertação controlada eficazes. [10]–[14] Apesar dos lipossomas apresentarem estabilidade biológica limitada, são biocompatíveis e a sua superfície pode ser funcionalizada. [11]–[13] Por outro lado, as micelas poliméricas apresentam algumas vantagens sobre outros sistemas de libertação controlada de substâncias, como o aumento da solubilidade do fármaco e a sua biocirculação prolongada. [12], [14]

As nanopartículas poliméricas são constituídas por polímeros de origem natural ou sintética. De uma maneira geral são dotadas de biocompatibilidade, biodegradabilidade, grande capacidade de modificação da sua superfície através de transformações químicas, excelente controlo farmacocinético e com possibilidade de encapsulamento e entrega de um vasto leque de agentes terapêuticos. Alguns exemplos dos principais componentes destas estruturas são a gelatina, quitosano e copolímeros de ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA), ácido poliláctico (PLA), ácido poliglicólico (PGA), poli (cianoacrilato de alquilo) (PACA), poli (metacrilato de metilo) (PMMA) e poli (cianoacrilato de butilo) (PBCA). [13] Muitas das nanopartículas são revestidas com um polímero biocompatível, como o PEG, para reduzir a imunogenicidade e para limitar a fagocitose de nanopartículas pelo sistema reticuloendotelial e consequentemente conduzindo ao aumento dos níveis de fármaco na corrente sanguínea em órgãos como o cérebro, intestinos e rins. [13]

As nanopartículas inorgânicas geralmente compreendem as nanopartículas de materiais cerâmicos ou de metais nobres, pois são as mais usadas para produzir uma variedade de nanopartículas de tamanho, forma e porosidade distintas. Exemplos de materiais cerâmicos utilizados incluem a sílica ( $\text{SiO}_2$ ) ou alumina ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ). Frequentemente os núcleos destes materiais podem ser feitos de óxidos e sulfuretos de metais bem como dos próprios metais. Por serem bastante fáceis de produzir com o tamanho e porosidade desejados bem como o facto de serem fisiologicamente estáveis tornam-se bastante atrativas na libertação de fármacos em doenças como o cancro e a diabetes. [12], [13]

Em relação às nanopartículas metálicas, estas são constituídas de uma maneira geral por metais nobres como prata e ouro e podem ter diferentes morfologias, tais como esferas, bastonetes, prismas ou cubos ocos. Estas nanopartículas são fáceis de sintetizar e devido às reduzidas dimensões a sua área superficial é muito elevada, permitindo uma maior capacidade para transportar substâncias ativas. A libertação das substâncias que transportam pode ocorrer em função de diferentes estímulos externos como radiação ou por ação de um campo magnético.

Geralmente, as nanopartículas magnéticas para fins terapêuticos são modificadas com polímeros biocompatíveis através do revestimento com adição de polímeros naturais (dextrano ou polietileno glicol (PEG)) ou sintéticos (poli (vinilpirrolidona) (PVP), polilisina (PLL) ou polietileneimina (PEI)). Estes sistemas são amplamente usados na terapia de tumores e em imagiologia por ressonância magnética. Por sua vez, devido ao seu tamanho reduzido associado ao efeito de aumento da permeabilidade e retenção dos tecidos (EPR), têm a capacidade de alcançar um tecido ou órgão específico diminuindo assim a distribuição de compostos tóxicos para o organismo, o que se traduz num tratamento mais eficaz mesmo com doses mais pequenas. Após a injeção destas partículas estas são capturadas pelo órgão alvo por aplicação local de um campo magnético. [12], [17]

As nanopartículas de natureza inorgânica possuem propriedades importantes que lhes conferem vantagens na libertação de fármacos e em diversas aplicações na imagiologia. Estas estruturas são relativamente estáveis em amplas gamas de temperatura e pH, através de modificações da sua superfície e conjugação com polímeros mantêm-se na corrente sanguínea por mais tempo e alcançam mais facilmente o tecido ou órgão alvo da respetiva terapêutica. No entanto também possuem desvantagens, a sua fraca biodegradabilidade e lenta dissolução podem tornar-se problemáticas para a segurança do indivíduo a longo prazo. [12], [13]

### 2.1.3. Hidrogéis e a Libertação Controlada de Fármacos

Os hidrogéis são redes poliméricas tridimensionais constituídas por homopolímeros ou copolímeros com capacidade para absorver grandes quantidades de água ou fluidos biológicos. Apesar da sua grande afinidade pela água estes não se dissolvem, intumescem em consequência das reticulações químicas e físicas presentes na sua estrutura. [5], [18]

Estes materiais podem ser usados na encapsulação e entrega orientada de proteínas, fármacos e materiais bioativos. Durante o seu fabrico é possível incorporar na sua rede polimérica propriedades interessantes como a capacidade de resposta correspondente a estímulos externos, como mudanças de pH e temperatura, bem como adesão para facilitar o direcionamento dos fármacos. A sua capacidade de intumescer de forma reversível contribui também para que a libertação de fármacos seja mais eficaz. Por outro lado a sua hidrofiliidade permite o aumento do tempo de circulação *in vivo* do dispositivo de administração por “despistar” a resposta imune do hospedeiro fazendo com que as atividades fagocíticas diminuam. [6]

A capacidade de reter grandes quantidades de água, quando se encontram em equilíbrio em meio aquoso permite apresentar propriedades semelhantes às dos tecidos vivos, tais como, consistência elástica e macia bem como uma baixa tensão superficial com água e fluidos biológicos. [19] Devido a estas características, além de serem muito usados na libertação de fármacos, são também muito usados em outras aplicações no sector médico e farmacêutico como na engenharia de tecidos para nervos e cartilagens, lentes de contacto, membranas de biossensores, revestimentos interiores de corações artificiais e pele artificial. [18] Na seção seguinte abordam-se estes materiais com mais detalhe.



## 2.2. Hidrogéis

### 2.2.1. Classificação e Principais Propriedades

Os hidrogéis podem ser classificados segundo diferentes critérios, nomeadamente de acordo com a natureza dos seus grupos funcionais, neutros ou iónicos, em relação ao método de preparação podendo ser constituídos por redes de homopolímeros ou copolímeros. Podem ainda ser classificados de acordo com a organização estrutural da rede polimérica como amorfos, semi-cristalinos, estruturas com pontes de hidrogénio, estruturas supramoleculares e agregados helicoidais, ou de acordo com a sua capacidade de resposta a estímulos externos como variações de pH, força iónica e temperatura do meio ou exposição a radiação eletromagnética. Estes materiais de estrutura tridimensional, de origem natural ou sintética, são constituídos por redes poliméricas hidrofílicas que, na presença de água ou fluidos biológicos, intumescem sem se dissolverem no meio. A capacidade de intumescerem está relacionada com a sua afinidade pela água devido à presença de grupos funcionais como  $-OH$ ,  $-CONH$ ,  $-CONH_2$  e  $-SO_3H$  na sua composição. Por outro lado, o facto dos hidrogéis não se dissolverem deve-se à reticulação física ou química das redes poliméricas. Alguns exemplos típicos de polímeros naturais usados neste contexto são o ácido hialurónico, alginato, dextrano, carragenano, quitosano, polilisina, colagénio, gelatina, agarose e pululano. [5], [18], [20], [21]

Apesar dos hidrogéis de origem natural apresentarem fracas propriedades mecânicas e poderem evocar respostas imunitárias/inflamatórias por parte do organismo, também oferecem diversas vantagens face aos hidrogéis de origem sintética, tais como a reduzida toxicidade, biocompatibilidade, biodegradabilidade. Além disso, possuem fragmentos biologicamente reconhecíveis que suportam a atividade celular entre outras notáveis propriedades físico-químicas que os tornam aptos para aplicações em sistemas de libertação de fármacos. Para além de todas estas vantagens, os hidrogéis requerem condições relativamente simples para serem preparados, dado que a formação de gel ocorre frequentemente à temperatura ambiente e raramente são necessários solventes orgânicos. Ao contrário dos hidrogéis de origem natural, os de origem sintética por vezes não são biocompatíveis, porém as suas estruturas bem definidas têm a capacidade de serem ajustadas à funcionalidade e degradabilidade desejadas e possuem também ótimas propriedades mecânicas. [5], [6] Para além das vantagens anteriormente referidas, os polissacarídeos são abundantes na natureza e estão imediatamente disponíveis pois podem ser obtidos a partir de algas, plantas, fungos, insetos, crustáceos, animais, culturas microbianas de estirpes seleccionadas ou através de técnicas de ADN recombinante e até de seres humanos. [20], [22]

Os polissacarídeos podem ser classificados como polieletrólitos e não polieletrólitos, que por sua vez se dividem em positiva ou negativamente carregados. Na lista dos polissacarídeos naturais aniónicos mais comuns na biomedicina encontram-se o alginato, o  $\kappa$ -carragenano, a heparina e o dextrano, enquanto nos cationicos se encontra o quitosano. Em relação aos polímeros de origem sintética, os mais comuns são o PEG, PLA e PLGA. [7], [21], [22]

A reticulação é uma propriedade crucial no intumescimento dos hidrogéis, que por sua vez afeta a capacidade de libertação de moléculas de substâncias ativas que nele estejam incorporadas. Quanto maior for o grau de reticulação menor é a capacidade de intumescimento, pois a sua estrutura polimérica é mais apertada

dificultando a mobilidade das cadeias do polímero. Apesar do grau de reticulação desempenhar um papel de extrema importância nas propriedades do material, a natureza da sua estrutura química também contribui significativamente para a sua capacidade de incorporação de água ou outros fluidos na sua rede. O intumescimento dos hidrogéis sensíveis ao meio pode ser afetado por estímulos específicos como alterações de temperatura, pH e força iônica. [18]

As propriedades mecânicas destes materiais são muito importantes para a sua utilização na indústria farmacêutica. Nesta área a sua principal aplicação passa por serem parte integrante de dispositivos de libertação controlada de agentes terapêuticos sensíveis (fármacos, proteínas, genes, etc.) e é importante que estes mantenham a sua integridade até que se atinjam os objetivos da terapêutica desejada. [18] A manipulação do grau de reticulação dos hidrogéis pode ser usada para obter as propriedades mecânicas pretendidas. Para se obter um hidrogel mais “forte” é necessário um maior grau de reticulação. O aumento do grau de reticulação não é ilimitado, isto é, existe um grau ótimo de reticulação para, simultaneamente, se obter um hidrogel “forte” mas elástico. Pode ainda usar-se outro método para ajustar as propriedades mecânicas dos hidrogéis a valores desejados, a copolimerização. Ao introduzir-se um co-monomero na estrutura permite o aumento da resistência do hidrogel através do aumento das ligações de hidrogénio. [18]

Os problemas de toxicidade dos dispositivos constituídos por hidrogéis, nomeadamente os de origem sintética, simples ou combinados com os de origem natural, estão relacionados com a presença de monómeros que não reagem e de oligómeros e iniciadores que podem escapar para o meio durante a sua aplicação. Para evitar este problema tem-se vindo a modificar a cinética de polimerização com o objetivo de atingir valores de conversão mais elevados, assim como proceder à lavagem exaustiva do produto final. Por outro lado a preparação de hidrogéis sem iniciadores também tem sido explorada, existindo métodos onde é usada radiação gama ao invés dos convencionais iniciadores. [18] A utilização de hidrogéis de polímeros de origem natural, de um modo geral, acarreta menos problemas de toxicidade.

### 2.2.2. Hidrogéis Sensíveis a Estímulos Externos

Geralmente os polissacarídeos formam géis que respondem a mudanças fisiológicas de temperatura e pH ou até mesmo de tensão mecânica. Estes biomateriais sofrem transições reversíveis de volume e/ou de fases quando o meio envolvente sofre alterações. Esta propriedade tem sido explorada no desenvolvimento de sistemas compósitos para aplicações acionadas remotamente incluindo bioadesivos e libertação controlada de fármacos, entre outras. [7], [19] Na figura 3 encontram-se os diferentes tipos de estímulos que podem ser responsáveis pelo intumescimento dos hidrogéis.



Figura 3 - Tipos de estímulos responsáveis pelo intumescimento dos hidrogéis. [adaptado de [17]]

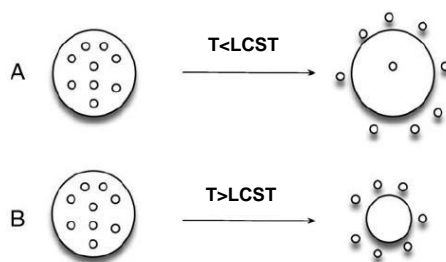
### 2.2.2.1. Hidrogéis Sensíveis à Temperatura

Os hidrogéis sensíveis à temperatura são bastante interessantes sob o ponto de vista farmacêutico devido à sua capacidade de intumescer e desintumescer em consequência da alteração da temperatura do meio circundante. Esta característica é essencial no desenvolvimento de dispositivos para liberação de fármacos controlada com sistema de *on/off* e biossensores. [18]

Os hidrogéis termossensíveis, em particular os de proveniência sintética, têm em comum a presença de grupos hidrófobos e podem ser classificados como sistemas positivos ou negativos em relação à sensibilidade de alterações da temperatura no meio. [18], [23]

A temperatura de solução crítica (CST) é definida como a temperatura à qual se verifica uma transição de fase, seja a transição gel-sol ou sol-gel. Desta forma, os polímeros termossensíveis sofrem mudanças drásticas no seu volume à medida que a temperatura do meio sofre alterações acima ou abaixo da CST. [10], [18], [23] Os hidrogéis com reação positiva a mudanças de temperatura possuem uma temperatura de solução crítica elevada (UCST), o que significa que este polímero se irá contrair quando arrefecido abaixo desta temperatura e intumescer quando se encontra acima desta. O inverso verifica-se para os hidrogéis com resposta negativa a alterações da temperatura pois estes têm uma temperatura de solução crítica inferior (LCST), o que se traduz na sua contração quando são aquecidos acima desta. É o caso dos géis de poli (N-isopropilacrilamida) (PNIPAAm) que são amplamente usados na preparação de hidrogéis sintéticos sensíveis à temperatura para aplicações de liberação controlada de fármaco. [23]

A presença de grupos hidrofóbicos e de grupos hidrofílicos no polímero irá contribuir para o decréscimo e aumento da LCST, respetivamente. [18], [23] Na figura 4 pode observar-se como ocorre a liberação controlada de fármacos utilizando hidrogéis termossensíveis. Na figura 4A mostra-se a liberação de um fármaco hidrofílico encapsulado no gel intumescido, devido à diminuição da temperatura abaixo da LCST, e ao consequente aumento de difusividade. Na figura 4B pode observar-se que um fármaco hidrofóbico é libertado da matriz quando a temperatura se encontra acima da LCST. [10]



**Figura 4 - Polímeros termossensíveis e a liberação de fármacos. [adaptado de [10]]**

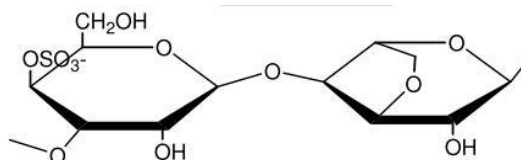
Além dos polímeros sintéticos, os polímeros naturais também têm a capacidade de formar hidrogéis sensíveis à temperatura. Como é o caso da gelatina ou do  $\kappa$ -carragenano, que se aborda detalhadamente em seguida.

#### ***$\kappa$ -carragenano***

O  $\kappa$ -carragenano é um polissacarídeo natural solúvel em água e insolúvel em solventes orgânicos, óleos ou gorduras. Como contém grupos sulfato é um polímero aniônico. Este polissacarídeo é extraído de

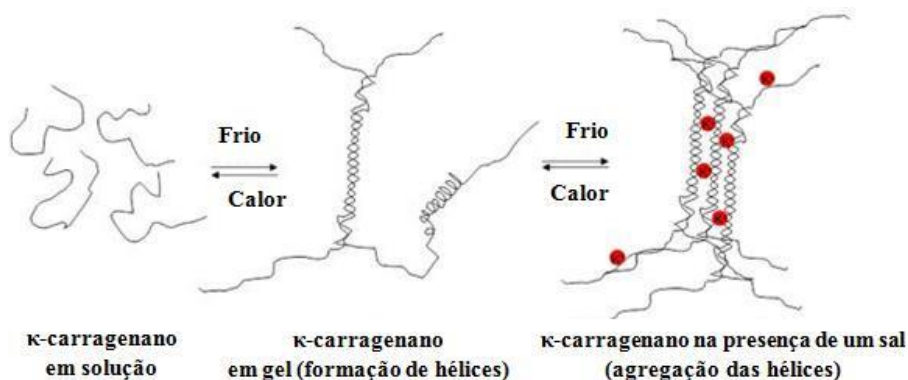
diversas espécies de algas marinhas vermelhas de estrutura primária baseada no dissacarídeo alternado como unidade de repetição  $\alpha$ - (1-3) -D-galactose-4-sulfato e  $\beta$ - (1-4) 3,6-anidro-D-galactose. [20], [24], [25]

O carragenano é comercializado sob diferentes formas de acordo com o seu grau de sulfatação. As três principais formas comercializadas são o  $\kappa$ -carragenano (mono- sulfato), o  $\iota$ -carragenano (di-sulfato) e  $\lambda$ -carragenano (tri-sulfato). Os dois primeiros são agentes gelificantes enquanto o terceiro é um agente espessante. A estrutura química do  $\kappa$ -carragenano encontra-se na figura 5. [20], [24]



**Figura 5 - Estrutura química da unidade dissacarídea do  $\kappa$ -carragenano. [7]**

A viscosidade das soluções de carragenano ou a *força* dos hidrogéis constituídos pelo mesmo são determinadas pela proporção de grupos sulfato e o equilíbrio de catiões presentes em solução. A viscosidade das soluções de carragenano diminui de forma reversível com o aumento da temperatura. A gelificação do  $\kappa$ -carragenano é termorreversível e envolve duas etapas distintas e consecutivas. Primeiro ocorre a transição da sua conformação linear para uma conformação em dupla hélice devido a arrefecimento seguida de agregação ordenada das hélices, que é promovida pela presença de catiões, dando origem a uma rede infinita. Para que este fenómeno aconteça é fundamental que estejam presentes catiões adequados, como potássio ou cálcio. Os iões de metais alcalinos mais eficazes na indução do processo de gelificação do  $\kappa$ -carragenano são o  $K^+$  e o  $Rb^+$ , visto que têm esta capacidade mesmo quando as concentrações, tanto de catião como de carragenano, são baixas. [24]–[26] Na figura 6 pode observar-se o mecanismo de gelificação do  $\kappa$ -carragenano.



**Figura 6 - Mecanismo de gelificação do  $\kappa$ -carragenano. [adaptado de [21]]**

A gelificação é termorreversível, o que significa que ao aquecer o gel pode obter-se de novo o  $\kappa$ -carragenano sob a forma de sol. Devido à sua biocompatibilidade e capacidade de formar hidrogéis termorreversíveis, estes hidrogéis têm sido amplamente usados como agentes gelificantes na indústria alimentar e excipientes na indústria farmacêutica. Nos últimos anos tem sido estudada a sua aplicação como suportes para libertação controlada de fármacos. Estudos recentes mostram a sua aplicação na encapsulação de células estaminais de tecido adiposo humano, condrócitos nasais humanos ou uma linha celular condrocítica (tecido de cartilagem). [27] Além de todas estas características, os carragenano apresentam também várias

propriedades farmacêuticas com grande potencial incluindo anti-tumoral, imunomoduladora, anti-hiperlipidêmico e anticoagulante. [24], [28]

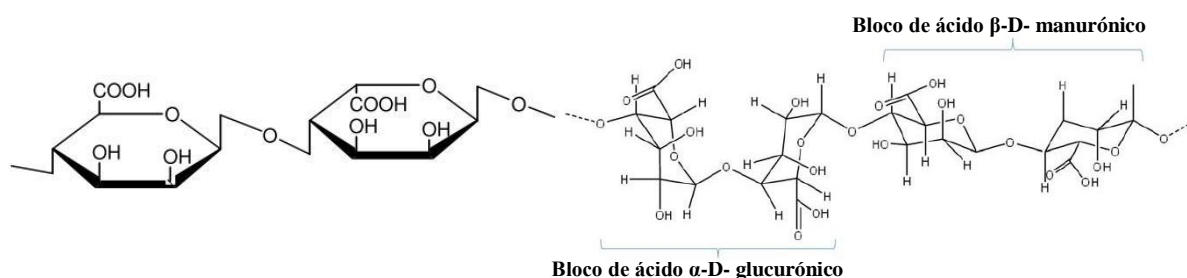
### 2.2.2.2. Hidrogéis Sensíveis ao pH

As alterações de pH no interior do corpo podem ser utilizadas para induzir uma resposta por parte do hidrogel uma vez que os diferentes órgãos e tecidos têm valores de pH diferentes e específicos. A presença de um ácido fraco ionizável ou um grupo funcional básico ligado à estrutura hidrofóbica do material é o elemento chave de um polímero sensível ao pH. Quando os grupos laterais são ionizados, as cadeias enrolam-se em resposta às repulsões electrostáticas das cargas geradas, por catiões ou aniões. O grau de ionização destes polímeros depende da concentração de grupos ácidos ou básicos. Os polissacarídeos usados como hidrogéis sensíveis a mudanças de pH podem ser aniônicos, como o alginato, ácido hialurônico e o sulfato de condroitina ou catiónicos, como o quitosano. [10]

Nestes géis, a ionização ocorre quando o pH do meio está acima do valor de pKa do grupo ionizável. À medida que o grau de ionização aumenta, assim como o pH do sistema, o número de cargas fixas aumenta resultando no aumento das repulsões electrostáticas entre as cadeias. Por conseguinte conduz ao aumento da hidrofilicidade da rede do hidrogel e como consequência maior intumescimento da mesma. Por outro lado, os hidrogéis catiónicos contendo grupos amina ionizam em meios onde o valor do pH é inferior ao valor de pKb das espécies ionizáveis. Deste modo, num meio com pH baixo a ionização aumenta e consequentemente as repulsões electrostáticas também tornando o hidrogel mais hidrofílico e intumescido. [18]

### *Alginato*

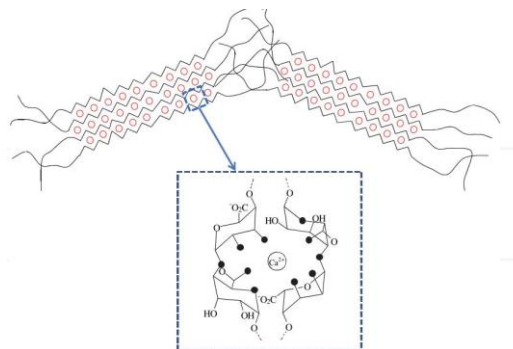
O alginato pode ser extraído da alga marinha castanha ou produzido por bactérias. Trata-se de um biopolímeros aniônico constituído por cadeias lineares de ácidos  $\alpha$ -L-glucurónico e  $\beta$ -D-manurónico como se pode ver na figura 7. Este composto é solúvel em água, tem a capacidade de formar géis de elevada porosidade nas condições adequadas, de ser biocompatível e com reduzida toxicidade. [5], [10], [20], [29]



**Figura 7 - Estrutura química (esquerda) e estrutura molecular (direita) do alginato . [7] [10]**

A solubilidade do alginato em água depende dos catiões associados. A gelificação deste polissacarídeo pode ser induzida na presença de iões cálcio. Na figura 8 ilustra-se a gelificação ionotrópica do alginato, resultante da interação entre os grupos aniônicos do alginato com iões de cálcio. As propriedades viscoelásticas dos géis de alginato dependem da temperatura, por exemplo, o módulo elástico diminui com o aumento da temperatura. No entanto os géis de alginato são, de um modo geral, termicamente mais estáveis que os de

carragenano apresentando valores da temperatura de transição gel-sol mais elevados e frequentemente acima de 100°C. [30]



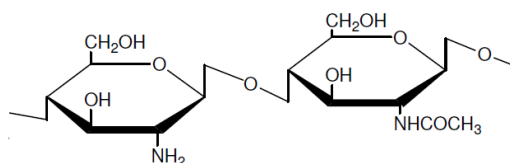
**Figura 8 - Gelificação do alginato por interação com íons  $\text{Ca}^{2+}$ . [21]**

A cinética de formação de géis de alginato costuma ser rápida resultando em géis suficientemente fortes para serem aplicados industrialmente e na biomedicina. Na área farmacêutica o alginato tem sido usado como excipiente em comprimidos. Devido à sua biocompatibilidade, mucoadesividade, porosidade e facilidade em ser manipulado, o alginato tem sido explorado com vista a ser usado na administração de proteínas, encapsulação de células e regeneração de tecidos. No entanto, não é degradado enzimaticamente pelos mamíferos. [10], [20] O alginato tem ainda a capacidade de formar complexos com policatiões tais como a polietileneimina (PEI), quitosano ou péptidos básicos como polilisina e poliarginina. [29] Esta estratégia tem vindo a ser estudada com o objetivo de melhorar a sua estabilidade mecânica e a resistência à erosão em diferentes fluidos biológicos, e desta forma otimizar a modulação da libertação de fármacos a partir de sistemas compostos por alginato. O quitosano e seus derivados bem como a poli-L-lisina são capazes de estabelecer interações iónicas com os íões carboxilato do alginato, formando um invólucro em redor dos sistemas compostos por alginato que consequentemente conduzem a uma maior resistência por parte do material. [20]

O alginato tem sido usado na entrega de proteína morfogenética de fatores de crescimento dos ossos (BMP-2 e BMP-7) através de microesferas complexadas com poli (4-vinilpiridina) e ácido algínico. Comercialmente existem vários pensos à base de alginato disponíveis tais como o Nu-Derm®, vendido pela Johnson & Johnson nos EUA, e Curasorb® pela Covidien, anteriormente registrado como Kendall ou AlgiSite®, vendido pela Smith & Nephew também nos EUA. [31]

### ***Quitosano***

O quitosano é um polímero natural derivado da quitina, principal constituinte dos exosqueletos dos crustáceos, insetos e dos fungos. Este biopolímero é obtido industrialmente através de um tratamento de desacetilação alcalina, devido ao qual ocorre a hidrólise dos grupos aminoacetil da quitina. [32]–[34] É um polissacarídeo linear constituído por unidades de repetição de N-acetilglucosamina e D-glucosamina, ligadas entre si por ligações (1→4) β-glicosídicas, distribuídas aleatoriamente ou em bloco ao longo da cadeia do mesmo, dependendo do método de obtenção a que foi sujeito (Figura 9). [32]–[34]



**Figura 9 – Estrutura química do quitosano. [7]**

O quitosano é uma base fraca, insolúvel em água e em solventes orgânicos, porém torna-se solúvel em soluções aquosas ácidas diluídas com  $\text{pH} < 6,5$ . Após a desacetilação, pode dissolver-se em meio ácido onde ocorre a conversão das suas unidades de glucosamina numa forma mais solúvel com grupos amina protonados tornando-se um biopolímero de elevada densidade de cargas positivas. [32], [34] O aumento da solubilidade também é possível ao remover 1 ou 2 átomos de hidrogénio dos grupos amino e, adicionando algumas partes hidrofílicas. [32] O facto de se tratar de um polímero catiónico e hidrossolúvel permitem que o quitosano possa interagir com polímeros negativamente carregados [5], como é o caso dos polímeros usados neste trabalho, o alginato e o  $\kappa$ -carragenano. A interação entre as cargas opostas dos polímeros permite a formação de hidrogéis por complexação polieletrólítica. Este polímero é considerado biodegradável, de baixa toxicidade, biocompatível, dotado de propriedades mucoadesivas e antimicrobiano. [32]–[34] Devido a todas estas propriedades tem sido amplamente estudado para aplicações em diversas áreas como a farmacêutica, para libertação de nutrientes e fármacos por administração oral, ocular, nasal ou subcutânea e transdérmica [7], [19], [32], [34], [35], a biomédica, para reparação de tecidos, como bioadesivo para suturas em locais do corpo delicados ou de difícil acesso, odontologia e ortopedia [7], [32], [33], e em aplicações biotecnológicas, para biomarcação, biodeteção [7]. É ainda utilizado como agente antimicrobiano [7], [32], e na área alimentar [34] e ambiental, como agente adsorvente no tratamento de efluentes da indústria têxtil e de águas residuais com iões de metais pesados [32]. Na área da nanotecnologia tem sido usado na preparação de matrizes para libertação controlada de fármacos devido às propriedades reativas, à natureza policatiónica e à facilidade com que se degrada enzimaticamente. [32] Também foi estudado na preparação de filmes compósitos metálicos (filmes de quitosano e nanobastonetes de ouro) e hidrogéis compósitos magnéticos (alginato/quitosano com nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) para aplicação como bioadesivo remotamente activado por laser ou como sistema de libertação controlada de fármacos, respetivamente. [7] Comercialmente existem produtos hemostáticos à base de quitosano, como as compressas Celox<sup>TM</sup> e HemCon<sup>®</sup>, a pasta tópica Aquanova<sup>®</sup> Ag e um penso dentário, Chitoseal<sup>®</sup> PAD. [31]

### 2.2.2.3. Hidrogéis Sensíveis a Radiação

Nos hidrogéis sensíveis à radiação incluem-se hidrogéis sensíveis à luz UV, Vis e NIR. Quando expostos a estes estímulos, estes hidrogéis sofrem mudanças fotomecânicas reversíveis. Uma vez que as partículas à escala nanométrica têm capacidade de proporcionar uma libertação de drogas seletiva por via da circulação sanguínea ou quando incorporadas num implante, a região de IV é a mais indicada visto que é nesta gama que os tecidos vivos absorvem menos radiação e se consegue assim uma maior penetração. [10], [36] Através da combinação de um hidrogel termossensível e de um cromóforo é possível dotar hidrogéis de sensibilidade à luz. A luz é absorvida pelos cromóforos e de seguida é dissipada sob a forma de calor pela matriz do mesmo. Este calor faz aumentar a temperatura afetando a rede do hidrogel termossensível levando à

indução de transição de fase da mesma. Desta forma dá-se a libertação do fármaco encapsulado na matriz. A substituição dos cromóforos por nanopartículas metálicas, como as de ouro, pode aumentar a eficácia da libertação do fármaco, dado que conduz a uma subida da temperatura maior e mais rápida. [22], [36]

### 2.2.3. Hidrogéis Nanocompósitos para Libertação de Fármacos

As propriedades físico-químicas e biológicas únicas dos hidrogéis aliadas à sua vasta diversidade fazem deles excelentes candidatos para sistemas de libertação controlada de fármacos. Estes sistemas de libertação de fármacos podem ser categorizados em sistemas controlados pelo tempo ou em sistemas induzidos por estímulos externos. [5] No âmbito da libertação de fármacos, os biopolímeros têm desempenhado um papel de extrema importância visto que as suas matrizes estabilizam as moléculas bioativas nelas encapsuladas evitando a sua perda ou degradação durante a libertação bem como efeitos secundários no organismo. [7]

Os polissacarídeos com capacidade de formar redes sensíveis a mudanças no meio onde estão inseridos, como é o caso dos hidrogéis, quando combinados com nanofases inorgânicas com propriedades óticas e/ou magnéticas constituem uma ferramenta poderosa na libertação controlada remota de substâncias. [7] A conformação das cadeias dos polissacarídeos é dependente não só do pH e força iónica do meio, particularmente no caso dos polieletrólitos, mas também da temperatura e concentração de certas moléculas. Esta dependência é benéfica para a libertação de fármacos visto que pode ser explorada para desencadear transições de fase através de estímulos físicos ou químicos. Os estímulos podem atuar diretamente no polissacarídeo, aplicando uma fonte de calor ou campo elétrico com consequente alteração da temperatura ou da distribuição das cargas, ou através de um intermediário que passa o sinal, como a absorção de radiação por nanopartículas metálicas ou de um campo magnético oscilatório por nanopartículas magnéticas que consequentemente elevam a temperatura local. [22] O aumento local da temperatura promovido por nanopartículas magnéticas, quando ativadas por um campo magnético alternado, ou por nanopartículas de ouro, quando ativadas por radiação ótica adequada, origina alterações estruturais do polissacarídeo termossensível e desta forma ocorre a libertação modulada do fármaco nele encapsulado. Em relação aos nanocompósitos magnéticos, para libertação de fármacos, têm sido investigados compósitos de alginato ou quitosano ou ainda heparina contendo nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , enquanto para hipertermia, foram descritos sistemas contendo as mesmas nanopartículas mas com quitosano ou acetato de pululano. [7] Compósitos de nanopartículas magnéticas têm vindo também a ser estudados para aplicação na terapia combinada da libertação controlada de doxorubicina e hipertermia, por ação de um campo magnético. [37]

Relativamente aos nanocompósitos metálicos, têm sido estudados hidrogéis nanocompósitos de  $\kappa$ -carragenano [28], quitosano, alginato, heparina e ácido hialurónico [7] contendo nanopartículas de ouro. A principal vantagem desta estratégia é a administração de fármaco através da sua libertação controlada de acordo com as necessidades de cada paciente. [7] A maioria dos estudos revela a utilização de nanopartículas metálicas esféricas ou em forma de bastonete como morfologias mais comuns na libertação controlada de fármacos a partir de hidrogéis nanocompósitos. [38]

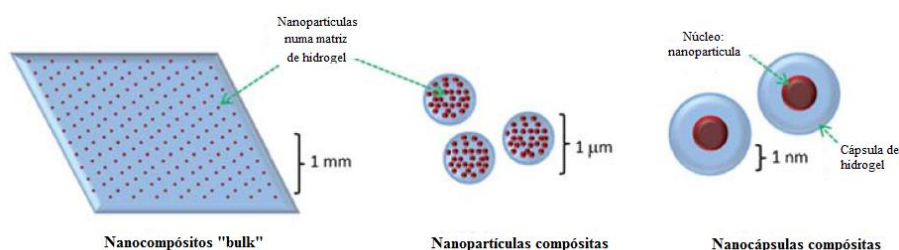
Desta forma verificou-se que os nanoprismas triangulares, morfologia em estudo neste trabalho, são pouco estudados para este efeito. A alteração do pH do meio também pode provocar a libertação do agente encapsulado. Neste contexto, sistemas de nanopartículas, têm-se usado o alginato e o quitosano como matriz



para libertação de insulina e fatores de crescimento, fármacos anticancerígenos como a doxorrubicina, tamoxifen ou paclitaxel. [32]

#### 2.2.4. Nanogéis

Nanogéis são, normalmente, dispersões aquosas de partículas de hidrogel constituídas por redes de polímero reticuladas física ou quimicamente à escala nanométrica. Estes sistemas são muito importantes na libertação de fármacos devido à sua estabilidade, grande capacidade de encapsulação e resposta a fatores externos, como a força iónica, pH e temperatura. [39] Nos últimos anos, o interesse no desenvolvimento de hidrogéis nanocompósitos para libertação de fármacos tem vindo a crescer, particularmente como uma nova classe de biomateriais. [40] Os sistemas de libertação com hidrogéis podem ser classificados de acordo com o tamanho, sob a forma “*bulk*”, normalmente sintetizados em filme, nanopartículas (nanogéis), nanocápsulas [40] ou micropartículas [41]. Na figura 10 podem ver-se algumas das diferentes formas de hidrogéis nanocompósitos.



**Figura 10 - Diferentes formas de hidrogéis nanocompósitos. [Adaptado de [40]]**

Existem diversos métodos para preparar nanogéis de polissacarídeos mas os mais comuns são a micro/nano-emulsão, dessolvatação e coacervação. Apesar destes métodos resultarem em nanopartículas de tamanho reduzido, útil na aplicação em estudo visto que uma partícula de menores dimensões possui uma maior área superficial, implicam o uso de solventes orgânicos, tensoativos, etapas de remoção e purificação. No entanto estes nanogéis contêm sempre alguns resíduos dos químicos envolvidos na sua preparação pelo que se tornou urgente o desenvolvimento de um método mais simples e que não envolvesse solventes ou tensoativos. [29] Desta necessidade surgiu o método de formação de nanogéis por complexação polieletrólítica. Quando dois polieletrólitos de cargas opostas são combinados e interagem através de interações electrostáticas pode ocorrer a formação de um hidrogel ionotrópico. O hidrogel formado mantém-se unido devido a entrelaçamentos moleculares, forças iónicas, pontes de hidrogénio ou forças hidrofóbicas. Estas interações são reversíveis e podem quebrar-se através de alterações das condições do meio, como pH, força iónica ou temperatura. De acordo com as concentrações dos polieletrólitos envolvidos poderão obter-se diferentes estruturas tais como esferas (*beads*), micropartículas ou nanopartículas. [33], [35]

Devido ao facto de não serem usados solventes orgânicos nem quaisquer tensoativos torna-se um método bastante interessante para aplicações biomédicas, pois a toxicidade é muito reduzida. Neste trabalho irá usar-se este método para produzir os nanogéis de κ-carragenano/quitosano e de alginato/quitosano.

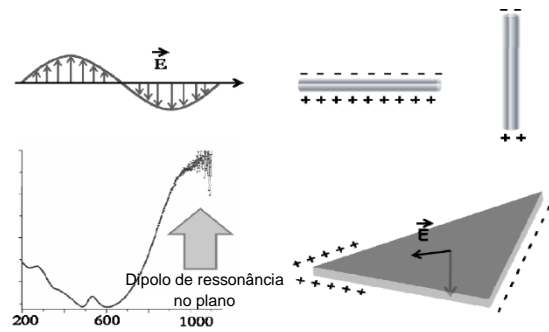
## 2.3. Nanopartículas de Ouro

As nanopartículas de ouro são umas das mais estáveis e mais investigadas nanopartículas metálicas no contexto da nanomedicina. O seu potencial tem vindo a ser reconhecido no meio científico devido às suas propriedades óticas únicas bastante relevantes em aplicações médicas, farmacêuticas e biotecnológicas. [42], [43]

### 2.3.1. Propriedades Óticas

As nanopartículas de ouro possuem duas importantes propriedades que as tornam apelativas para aplicações terapêuticas: a possibilidade de funcionalização da sua superfície, através da funcionalização com anticorpos e outras biomoléculas, e os efeitos óticos através da ressonância de plasmão de superfície (SPR). Devido a este efeito as partículas podem absorver e dispersar energia com intensidade superior em cerca de cinco a seis ordens de grandeza que os corantes orgânicos fototérmicos e que emissão da maioria das moléculas fluorescentes. Estes atributos têm vindo a ser explorados para aplicações terapêuticas com o objetivo de obter um maior aquecimento localizado ou para libertação de fármacos [8], [44]

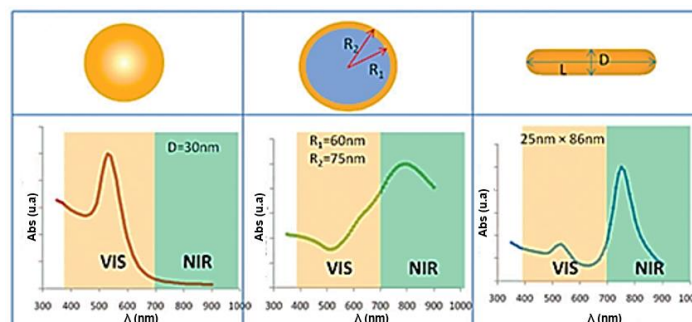
Ao expor as nanopartículas metálicas a radiação eletromagnética, a energia é absorvida pela partícula e dissipada sob a forma de calor ou reemitida na mesma frequência (dispersão de Rayleigh) ou com uma frequência deslocada (dispersão de Raman). [8], [45] Quando as nanopartículas sofrem esta exposição à luz, o campo eletromagnético oscilante desta induz a oscilação coerente dos eletrões livres, os eletrões da banda de condução, do metal. As energias destas oscilações encontram-se quantizadas e os respetivos quanta de energia designam-se por plasmões de superfície (SP). De forma resumida, o efeito SPR é a oscilação ressonante de eletrões livres da nanopartícula de metal com a luz. A oscilação de eletrões ao longo da interface entre um metal e o meio dielétrico circundante provocam a deslocalização da carga relativamente à rede catiónica dando origem à formação de oscilação do dipolo no sentido do campo elétrico da luz. [45], [46] A diferença de distribuição de cargas à superfície da partícula dá origem a uma força restauradora, verificando-se condições de ressonância quando a oscilação dos eletrões livres está em fase com a radiação eletromagnética, isto é, para o valor de frequência de ressonância do plasmão de superfície (SPR). [46] Este efeito traduz-se no aparecimento de uma banda de absorção no espectro ótico das nanopartículas metálicas. Para nanopartículas de ouro com formato esférico, a banda SPR apresenta um máximo a 520 nm, o que explica a coloração rosada das suspensões de nanoesferas de ouro. [8] Na figura 11 é possível observar as oscilações plasmónicas induzidas pelo campo elétrico ao interagir com as nanopartículas de ouro bem como a representação dos modos dipolar e quadripolar dos nanoprismas de ouro.



**Figura 11 - Oscilações plasmônicas induzidas pelo campo elétrico no modo transversal e longitudinal (A); espectro de absorção de nanoprismas de ouro onde se mostra a contribuição do modo de ressonância no plano e representação dos modos dipolar e quadripolar dos nanoprismas de ouro. [adaptado de [47]]**

Devido à anisotropia dos nanoprismas, as bandas longitudinais de SPR aparecem dependendo da orientação dos mesmos em relação à radiação incidente. As partículas com esta morfologia apresentam quatro modos de bandas longitudinais, os modos no plano e fora do plano que podem ser dipolares e quadripolares. A maior contribuição no espectro de VIS-NIR destas nanopartículas é o modo dipolar no plano que se localiza na região do NIR. [47]

Para algumas aplicações biomédicas pode ser conveniente desviar o comprimento de onda máximo de absorção para a região do infravermelho próximo (NIR) pois os tecidos humanos são mais transparentes a estes comprimentos de onda. Este desvio pode ser conseguido aumentando a interação dipolo-dipolo entre nanoesferas de ouro agregadas ou diminuindo a simetria das partículas. É o caso dos nanobastonetes ou de partículas compostas por um núcleo dielétrico revestido por uma capa de Au (figura 12). [8] A razão de aspeto (razão entre o comprimento e a largura do nanobastonete e a espessura da capa de Au podem ser ajustadas de modo a que a banda SPR surja na região do NIR permitindo uma absorção mais segura e efetiva. De notar que para os nanobastonetes observam-se duas bandas de plasmão, uma a maiores comprimentos de onda que corresponde à SPR ao longo da direção longitudinal e outra a menores comprimentos de onda atribuída à SPR ao longo da direção transversal. [45] Na figura 12 podem observar-se as propriedades óticas de algumas nanopartículas de ouro com diferentes morfologias.



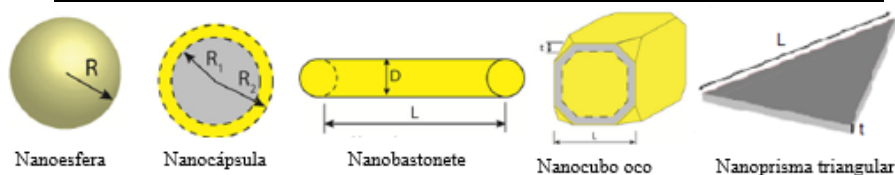
**Figura 12 – Propriedades óticas de algumas nanopartículas de ouro. [adaptado de [45]]**

A razão entre a dispersão e absorção aumenta drasticamente para maiores tamanhos de partículas, o que permite orientar a escolha da morfologia destas de forma adequada para cada aplicação biomédica. Para imagiologia clínica são preferidas nanopartículas maiores pois possuem maior eficiência de dispersão enquanto na terapia fototérmica são preferidas nanopartículas de dimensões reduzidas visto que absorvem a maioria da

luz. [44] Na tabela 2 e figura 13 podem observar-se as dimensões habituais e razão de aspeto das nanopartículas metálicas, respetivamente.

**Tabela 2 - Dimensões típicas das diferentes nanopartículas de ouro. [Adaptado de [47], [48]]**

Morfologia	Intervalo de Dimensões (nm)
Nanoesfera	$R = [20 - 80]$
Nanocápsula	$R_1 = [20 - 40]$ ; $R_2 = [30 - 50]$
Nanobastonete	$D = [14,5 - 15]$ ; $L = [3,3 - 46]$
Nanocubo oco	$L = 36,7$ ; $t = 3,3$
Nanoprisma Triangular	$L = [40 - 90]$ ; $t = 20$



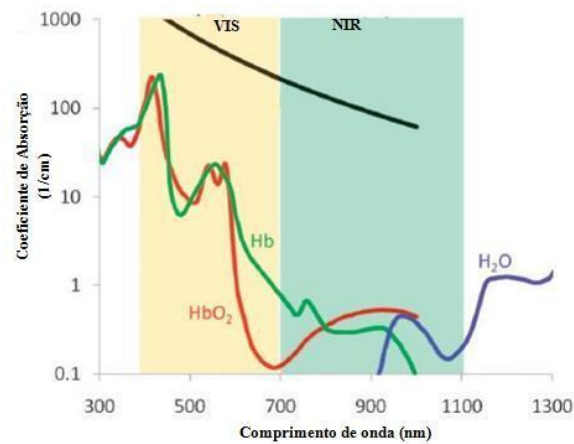
**Figura 13 - Morfologias e dimensões de nanopartículas metálicas. [Adaptado de [47], [48]]**

Para além da forma e tamanho das nanopartículas, a banda SPR também é afetada pela constante dielétrica do meio circundante e a distância entre nanopartículas vizinhas que, por sua vez, determina o acoplamento plasmónico entre partículas. A variação concertada destes parâmetros permite o ajuste das propriedades óticas das nanoestruturas de ouro. [24], [26]

### 2.3.2. Efeito Fototérmico

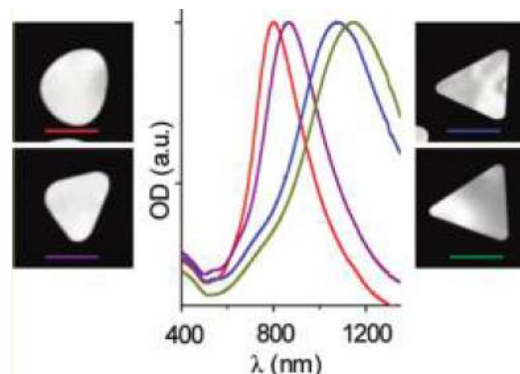
As nanopartículas de ouro provocam aquecimento localizado quando irradiadas com luz. À conversão de energia da luz em calor designa-se por efeito fototérmico. [21] Este efeito é criado pela excitação ótica e relaxação não-radiativa da ressonância de plasmão de superfície (SPR) de uma nanopartícula. [50] Dentro deste processo de aquecimento, mediado pela SPR, a luz absorvida pela nanopartícula gera uma distribuição de eletrões não-equilibrada que decai via dispersão eletrão-eletrão. O gás quente dos eletrões equilibra-se com a rede de fonões que transferem esta energia para o meio envolvente, o que resulta no aumento localizado da temperatura. O processo de transferência de energia é rápido,  $10^{-10}$ - $10^{-12}$  s, e eficiente. [50] O efeito fototérmico é despoletado pela absorção de radiação pelas nanopartículas de ouro. Como tal, para tirar partido deste efeito é necessário garantir uma adequada absorção de luz por parte das nanopartículas. Os tecidos biológicos são compostos por várias estruturas e componentes que combinados criam um panorama ótico complexo.

A capacidade de absorção de radiação de cada componente varia com o comprimento de onda (Figura 14) no entanto a absorção total dos tecidos depende da sua composição. Os principais cromóforos presentes no tecido são a água, a hemoglobina (Hb), oxiemoglobina ( $HbO_2$ ) e a melanina, e estes determinam a interação da radiação com o próprio tecido. [45]



**Figura 14 - Propriedades óticas de alguns componentes dos tecidos. [adaptado de [45]]**

Como se pode verificar na figura 14, a hemoglobina e a melanina absorvem mais na zona do visível enquanto a água absorve mais na região do IV. Na janela espectral entre os 700-1100 nm, que se encontra na região do infravermelho próximo (NIR), a absorção por parte destes cromóforos é menor e consequentemente a radiação com este comprimento de onda apresenta uma capacidade de penetração mais profunda (centímetros) nos tecidos biológicos. Para um efeito fototérmico eficiente, a morfologia das NPs de ouro, deverá ser devidamente ajustada de modo a que a banda SPR se localize neste intervalo. [45] Exemplos de possíveis morfologias adequadas são os nanobastonetes e as nanocápsulas de ouro, tal como mencionado na secção anterior. No entanto, os métodos de produção de nanopartículas destas morfologias implicam a utilização de um tensoativo catiónico bastante conhecido e tóxico, o brometo de cetiltrimetilamónio (CTAB). Então surge a possibilidade de preparar, neste trabalho, nanoestruturas com morfologia adequada originando uma banda de plasmão intensa na zona do NIR e sem adição de qualquer tensoativo, os nanoprismas triangulares (Figura 15). [9]



**Figura 15 – Espectro Vis-NIR de nanoprismas triangulares e nanodiscos de ouro mostrando a localização da banda SPR na região do NIR. [9]**

### 2.3.3. Aplicações na Biomedicina

As Au NPs têm uma vasta gama de propriedades que as tornam adequadas para aplicações biomédicas. Estas nanopartículas tornam-se inertes quando, por exemplo, estabilizadas em biopolímeros, contribuindo para a baixa toxicidade e boa biocompatibilidade, que são requisitos para aplicações biológicas. A flexibilidade dos métodos de preparação de NPs de Au com tamanho e forma variada facilita a seleção de dimensões ótimas

para o encapsulamento de agentes terapêuticos, tais como proteínas, péptidos, oligonucleótidos ou pequenas moléculas de fármacos. [38]

As propriedades intrínsecas das nanopartículas tornam-nas únicas e muito versáteis em diversas áreas. Na medicina podem ter várias aplicações, desde diagnóstico a tratamento de doenças. Estas podem ser usadas em imagiologia clínica, libertação localizada de fármacos e em hipertermia. [8], [51] Na figura 16 apresentam-se as principais aplicações das nanopartículas de ouro na biomedicina.

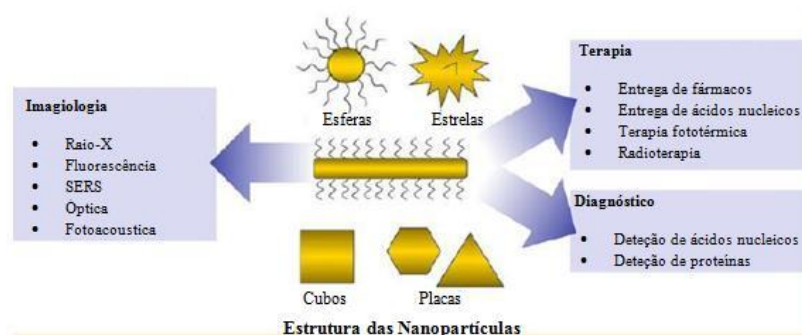


Figura 16 - Aplicações das nanopartículas de ouro na biomedicina. [adaptado de [38]]

### 2.3.3.1. Diagnóstico

As Au NPs têm aplicações interessantes no que diz respeito ao diagnóstico molecular. Estão dotadas de uma elevada área específica e podem ser funcionalizadas com o objetivo de detetar alvos específicos, oferecendo baixos limites de deteção e maior seletividade que as estratégias convencionais. As suas principais utilizações são ao nível da deteção de analitos como gases, iões, marcadores de proteínas ou ADN. [38] No diagnóstico de doenças são importantes na deteção de ácidos nucleicos e de proteínas, método que tem como base a mudança substancial das propriedades de absorção de luz mediante a agregação das nanopartículas e extinção da fluorescência à sua superfície, respetivamente. Todas as morfologias são aplicáveis mas na prática as nanoesferas são as mais comuns. [38]

### 2.3.3.2. Imagiologia

As nanopartículas de ouro têm sido amplamente usadas na imagiologia clínica devido à sua grande capacidade de absorção de luz. A versatilidade de forma e tamanho fazendo destas os melhores agentes de contraste utilizados até agora. As suas características como agentes de contraste permitem-lhes ser usadas em tomografia computadorizada, na citometria de fluxo, e ultrassom. [38]

### 2.3.3.3. Terapia

#### *Libertação de Fármacos*

A libertação de fármacos a partir de nanopartículas de ouro é fácil e simples bastando um estímulo externo, tal como a radiação, para ajudar no controlo da taxa e local de libertação. [48], [52] Uma vez que as nanopartículas se encontrem no tecido alvo, a libertação da carga é provocada por aquecimento. Para que se consiga alcançar o grau de precisão necessário e para obter o comprimento de onda de excitação correto, a escolha mais adequada como fonte de luz será um laser. [8]

As nanopartículas encontram-se frequentemente incorporadas em matrizes poliméricas, originando nanocompósitos, o que evita a sua agregação e aumenta a sua estabilidade e compatibilidade com o meio biológico. Os nanocompósitos de polissacarídeos podem ocorrer sob duas formas, em redes macroscópicas (nanocompósitos “*bulk*”) ou em dimensões na ordem dos micrómetros ou até abaixo destes. [7] Dependendo das dimensões, estes dispositivos podem ser implantados no corpo humano ou injetados na corrente sanguínea.

### ***Termoterapias***

#### **Hipertermia**

A aplicação localizada de calor é um conceito bem conhecido no âmbito da medicina tendo sido explorada extensivamente para o tratamento de cancro e outras doenças. [8] A introdução de nanopartículas de ouro nesta terapia aumenta a sua eficácia cerca de vinte vezes em relação aos corantes convencionais, visto que estes possuem menor eficiência de absorção e são fotodegradáveis. [8], [53] A irradiação de luz com comprimento de onda adequado induz o aumento de temperatura no local de incidência conduzindo à ablação fototérmica das células na periferia. Como resultado, o aumento da temperatura causa desnaturação das biomoléculas bem como danos nas células. Associado a estes fenómenos, a irradiação seletiva em tumores e a maior acumulação destes sistemas nos tecidos tumorais em relação aos tecidos saudáveis pode fazer das nanopartículas de ouro uma ferramenta poderosa na luta contra o cancro. [38] A utilização de nanopartículas de ouro na terapia do cancro ainda se encontra sob investigação clínica ou em ensaios clínicos, como a AuroLase<sup>®</sup>, Aurimune<sup>™</sup> ou Nano-flare. Nesta área de tratamento não são apenas usadas nanopartículas de ouro, a par destas também se encontram em investigação e ensaios clínicos nanopartículas de óxido de ferro, as NanoTherm<sup>®</sup>. Na tabela 3 podem ver-se alguns exemplos de nanopartículas metálicas usados na terapia térmica de cancro.

**Tabela 3 - Nanopartículas metálicas usados na terapia térmica do cancro. [Adaptado de [54]–[58]]**

<b>Nanopartículas</b>	<b>Exemplos</b>	<b>Aplicação da terapia termal</b>	<b>Indicações</b>	<b>Estado até 2013</b>
Metálicas	Aurimune <sup>™</sup> (CYT-6091)	Nanopartículas de ouro coloidal marcado com TNF para terapia térmica de tumores sólidos	Tumores sólidos	Fase II
	AuroLase <sup>®</sup>	Nanocápsulas de ouro com revestimento de sílica acumuladas passivamente dentro dos tumores sólidos onde são ativadas por laser na zona do NIR provocando o seu aquecimento	Cancro no pescoço e cabeça	Fase I

Em certos tecidos, temperaturas acima dos 42°C podem induzir à morte celular enquanto as células, cancerosas ou não, quando aquecidas entre os 41 e os 47°C começam a mostrar evidências de apoptose. Se a temperatura estiver acima dos 50°C a morte celular está pode estar associado à morte celular programada, a apoptose, mas está associada ainda mais à necrose. A necrose é mais rápida a destruir as células pois a certa temperatura as proteínas desnaturam instantaneamente à medida que as bicamadas lipídicas degeneram. No entanto este método terapêutico também possui limitações, algumas proteínas conseguem tolerar o aumento de temperatura do meio e resistem a vários ciclos deste tratamento. [59]

### *Hipertermia e o Cancro*

Como já foi referido anteriormente, as terapias de cancro que envolvem NPs metálicas ou magnéticas ainda se encontram sob investigação ou ensaios clínicos. No entanto, atualmente é possível encontrar no mercado algumas soluções para a terapia do cancro à escala nanométrica como as antraciclinas lipossómicas onde se incluem Doxil, Myocet (administrado como adjuvante da hipertermia) e DaunoXome, além das antraciclinas encontram-se também no mercado Abraxane e Oncaspar. Em relação às soluções nanométricas em hipertermia, envolvendo nanopartículas de ouro, tem-se a AuroLase®, Aurimune™ ou Nano-flare, enquanto a NanoTherm® envolve a utilização de partículas de óxido de ferro, todos estes exemplos encontram-se na sua maioria em fase de ensaios clínicos como já foi referido anteriormente. [54]- [58] Para além das monoterapias usadas no tratamento do cancro é comum combinarem-se diferentes terapias para que o tratamento seja mais eficaz e a taxa de reincidência seja menor. Os exemplos de combinações de hipertermia fototérmica com nanopartículas de ouro incluem o direccionamento e libertação de fármacos bem como radioterapia.

### *Hipertermia e Quimioterapia*

Ao longo do tempo tem-se vindo a estudar a aplicação simultânea de hipertermia localizada, numa gama de temperaturas de 42-45 °C, e de agentes quimioterapêuticos devido às alterações provocadas no microambiente envolvente que fazem com que a libertação das substâncias ativas transportadas pelos nanovetores ou nanocompósitos aumente. Esta combinação permite obter um resultado mais eficaz uma vez que se verifica uma maior morte celular relativamente ao uso isolado de quimioterapia, como se verifica na quimioterapia hipertérmica intra-peritoneal (QIPHTO). A utilização de nanopartículas de ouro juntamente com fármacos anti-cancro encapsulados em lipossomas aumentam a eficácia da libertação quando se faz incidir uma fonte de radiação, como é exemplo a injeção de microesferas de copolímeros de PLGA onde são encapsuladas paclitaxel (PTX) e nanocápsulas esféricas de ouro. Embora pareça uma solução ideal, a relação entre hipoxia, a hipertermia, a concentração de iões de hidrogénio e a morte celular não é bem conhecida bem como a dose ideal entre hipertermia e quimioterapia. Outra limitação é o facto desta combinação de técnicas ser apenas aplicável e eficiente quando praticamente todo ou quase todo o tumor esteja extinto das superfícies peritoneais. O uso de agentes quimioterapêuticos e de tratamentos hipertérmicos aumentou a taxa de resposta dos pacientes de melanoma com metástases para cerca de 94%. [45], [59]

### *Hipertermia e Radioterapia*

A radioterapia mostra-se mais eficaz quando associada à hipertermia devido à oxigenação e radiosensitização dos tumores. Ao aquecer e irradiar o tumor ao mesmo tempo é muito importante nesta junção de terapias visto que obtêm resultados mais promissores. Estudos clínicos mostram que ao combinar-se hipertermia e radioterapia obtém-se um aumento de resposta de 16 para 26% em diversos cancros. [45], [59]

## **2.4. Azul-de-metileno**

O azul-de-metileno (AM) foi o primeiro composto sintético usado como corante antisséptico em terapia clínica. Mais tarde, a sua utilização foi-se difundindo na quimioterapia antes do aparecimento das



sulfonamidas e penicilina. Atualmente, este fotossensibilizador, possui diversas funções na medicina, quer em diagnóstico como em terapia. As suas principais aplicações são no tratamento de metemoglobina, de infecções bacterianas e virais, de cancro, de depressão e psicose mas também tem sido usado como *tracer* cirúrgico nos sistemas urinário e gastrointestinal. [60]–[62]

O nome químico é cloreto de tetrametilitionina ou cloreto de metiltionina e é um corante catiónico com fórmula química  $C_{16}H_{18}ClN_3S \cdot 3H_2O$ , cuja estrutura se apresenta na figura 17. Trata-se de um composto aromático heterocíclico pertencente à família das fenotiazinas tricíclicas solúvel em água e em solventes orgânicos. [60], [61], [63] Exibe uma coloração azul forte característica do seu estado oxidado que tem uma forte banda de absorção na região 550-700 nm com absorvidade molar máxima de  $85000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  a 664 nm. [60], [62]



Figura 17 – Estrutura do azul-de-metileno. [64]

Em condições fisiológicas comporta-se como um catião azul que sofre um ciclo redox catalítico onde é reduzido pela nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato (NADPH) ou pela tioredoxina dando origem a leucoMB, uma espécie neutra e incolor, que posteriormente é novamente oxidada pelo  $O_2$  de forma natural. [61] Dada a sua hidrofilicidade, propriedades fotodinâmicas, carga positiva e facilidade de associação a nanoplateformas, o AM pode então ser facilmente administrado no organismo tornando-se bastante útil e atrativo em fototerapia e igualmente como agente quimioterapêutico. [60], [62], [64] Os biopolímeros usados neste trabalho, o  $\kappa$ -carragenano e o alginato, são ambos aniônicos visto que contêm grupos sulfato e carboxilo, respetivamente, o que torna possível a formação de complexos com o AM através de interações eletrostáticas reversíveis. [65] Por essa razão espera-se que as plataformas aqui desenvolvidas sejam úteis na encapsulação e libertação gradual de AM.

## 2.5. Modelos Cinéticos para Libertação de Fármacos

Os hidrogéis possuem um conjunto de características únicas que combinadas fazem deles um excelente material para a libertação controlada de fármacos. Os mecanismos de libertação diferem dependendo da natureza química da matriz e do fármaco, e da geometria da plataforma, afetando a cinética de libertação. Assim sendo, tornou-se essencial desenvolver modelos matemáticos que pudessem prever como o agente encapsulado é libertado da matriz de hidrogel ao longo do tempo. Estes modelos são desenvolvidos com base no passo limitante da velocidade de libertação, sendo que esta pode ser controlada por difusão, quimicamente ou por intumescimento. [6], [18] O controlo por difusão é o mais usado para descrever a libertação a partir dos hidrogéis embora também sejam importantes modelos baseados na erosão e degradação das matrizes poliméricas. Existem ainda modelos matemáticos com base em métodos estatísticos [66], modelos empíricos/semi-empíricos [67], entre outros. Os modelos baseados em mecanismos tentam descrever fenómenos reais de libertação como a difusão, dissolução, intumescimento, erosão, precipitação e/ou degradação através de equações matemáticas. Ao contrário dos modelos baseados nos mecanismos reais de

transferência de massa, os modelos empíricos/semi-empíricos baseiam-se apenas no tratamento matemático parcialmente descritivo deixando de fora os fenômenos físicos, químicos e/ou biológicos que realmente ocorrem traduzindo-se num fraco poder preditivo da liberação de fármacos. No entanto são bastante úteis na comparação de diferentes tipos de perfis de liberação de fármacos usando um parâmetro específico. [67] De seguida descrevem-se os modelos e equações mais utilizadas para descrever a cinética de liberação de fármacos a partir de matrizes de hidrogéis.

### 2.5.1. Equações de Cinética

#### 2.5.1.1. Ordem Zero

A equação 1 descreve a dissolução de fármacos a partir de formas de dosagem farmacêuticas que não desagregam e que libertam o fármaco lentamente ao longo do tempo assumindo que a área não se altera e que não se alcançam condições de equilíbrio. [68]

$$Q_t = Q_0 + k_0 t \quad \text{Equação 1}$$

Onde  $Q_t$  é a quantidade de fármaco dissolvido no instante  $t$ ,  $Q_0$  é a quantidade inicial de fármaco na solução (usualmente 0) e  $k_0$  a constante cinética de liberação de ordem 0 expressa em unidades de concentração/tempo. Os parâmetros cinéticos são calculados através da representação da fração cumulativa de fármaco libertado em função do tempo. [69] As formas de dosagem farmacêutica que seguem este perfil libertam a mesma quantidade de fármaco por unidade de tempo tornando-se o método ideal de liberação pois consegue atingir uma ação farmacológica prolongada. Esta equação cinética é usada para descrever a dissolução de fármacos de diversos tipos de formas de dosagem farmacêutica de liberação modificada como sistemas transdérmicos, comprimidos revestidos com fármacos pouco solúveis dispersados na sua matriz, sistemas osmóticos, entre outros. [68], [70]

#### 2.5.1.2. Ordem Um

A equação cinética de primeira ordem é frequentemente usada para descrever a absorção e/ou eliminação de alguns fármacos em sistemas onde a velocidade de liberação depende da concentração do fármaco. [69] As equações 2 e 3 descrevem a cinética de ordem 1.

$$\frac{dQ}{dt} = kQ \quad \text{Equação 2}$$

$$\ln\left(\frac{Q_t}{Q_0}\right) = kt \quad \text{Equação 3}$$

Onde  $Q_t$  é a quantidade de fármaco dissolvido ou libertado no instante  $t$ ,  $Q_0$  é a quantidade inicial de fármaco em solução e  $k$  a constante cinética de liberação de ordem 1 expressa em unidades de tempo<sup>-1</sup>. A representação gráfica do logaritmo da fração cumulativa de fármaco libertado em função do tempo é linear. [69] A equação 3 pode ser usada para descrever a dissolução do fármaco em formas de dosagem farmacêutica, tais como aquelas que contêm fármacos solúveis em água em matrizes porosas, que libertam o fármaco de

forma proporcional à quantidade de fármaco que permanece no seu interior logo a quantidade de fármaco libertada por unidade de tempo diminui. [68], [70]

## 2.5.2. Modelos Cinéticos

### 2.5.2.1. Korsmeyer-Peppas

O modelo semi-empírico de Peppas que descreve a libertação de fármacos a partir de sistemas poliméricos pode também ser chamado de *Power Law*. Este modelo pode ser considerado uma equação geral útil na descrição de vários mecanismos de transporte como a difusão Fickiana, transporte não-Fickiano e cinética de ordem 0 (com taxa constante) e é representado pela equação 4:

$$\frac{M_t}{M_0} = kt^n \quad \text{Equação 4}$$

Onde  $M_t$  e  $M_0$  são as quantidades cumulativas absolutas de fármaco libertado no instante  $t$  e no infinito, respetivamente,  $k$  é a constante que reflecte a estrutura e geometria do sistema e  $n$  é o expoente de libertação que indica qual é o mecanismo de libertação envolvido. [6], [67], [71], [72] A equação 4 é aplicável até 60% de quantidade total de fármaco libertado. [18] Desta forma os dados experimentais são representados da forma  $\ln(\frac{M_t}{M_0})$  em função de  $\ln(t)$  para  $M_t/M_0 \leq 60\%$ . [69]

A tabela 4 mostra a relação entre o expoente de libertação deste modelo com a geometria do sistema e mecanismo de libertação envolvido no processo. A *power law* pode ser vista como a generalização da observação de que a sobreposição de dois mecanismos de transporte aparentemente independentes, como a difusão Fickiana e o caso II de transporte. O modelo descreve muitas vezes o intumescimento dinâmico e a libertação do fármaco de polímeros vítreos independentemente da forma constitutiva da equação e do tipo de relação entre a relaxação e a difusão. [71], [72]

Na geometria plana existem dois casos de especial atenção, quando  $n=0,5$  a libertação é controlada pela difusão e quando  $n=1,0$  é controlada pelo intumescimento do polímero, a cinética é de ordem 0 e a libertação é independente do tempo. Neste caso, a relaxação do polímero ocorre devido à absorção de água constituindo o passo limitante da velocidade do processo de libertação de fármaco. A água atua como um agente plasticizante conduzindo à diminuição da temperatura de transição vítrea do polímero. Quando a temperatura de transição vítrea é igual à temperatura do sistema, as cadeias de polímero passam do estado vítreo ao elástico à medida que ocorre o aumento da mobilidade das mesmas e a expansão do volume. [71]

Por outro lado, quando este expoente se encontra entre 0,5 e 1,0 ocorre a sobreposição dos dois fenómenos referidos e o transporte é anómalo. Estes valores extremos são apenas válidos para a geometria plana, para esferas e cilindros foram derivados outros valores que também figuram na tabela 4. [67], [71]

**Tabela 4 - Expoente de libertação  $n$  do modelo e mecanismos de libertação de acordo com a geometria do sistema de libertação controlada de fármaco (adaptado de [6], [66], [67], [71])**

Expoente, $n$			Mecanismo de Libertação
Filme	Cilindro	Esfera	
0,5	0,45	0,43	Caso I de transporte: Difusão Fickiana
0,5< $n$ <1,0	0,45< $n$ <0,89	0,43< $n$ <0,85	Difusão não-Fickiana, transporte anómalo
1,0	0,89	0,85	Caso II de transporte: Intumescimento do polímero

### 2.5.2.2. Higuchi

Higuchi desenvolveu diversos modelos teóricos para estudar a libertação de fármacos solúveis em água e fármacos pouco solúveis incorporados em matrizes semi-sólidas e/ou sólidas. [70] Quando se aplica este modelo a sistemas de libertação controlada de fármacos é necessário ter em conta algumas considerações tais como: [71]

- i) A concentração inicial de fármaco no sistema é maior que a solubilidade do fármaco
- ii) A análise matemática baseia-se na difusão unidimensional
- iii) O diâmetro das partículas de fármaco é inferior à espessura do sistema
- iv) O intumescimento ou dissolução da matriz são desprezáveis
- v) A difusividade do fármaco é constante
- vi) Condições perfeitas de imersão do sistema

A dissolução a partir de uma matriz planar homogénea pode ser descrita pela equação 5: [70]

$$Q_t = \frac{M_t}{A} = \sqrt{D(2c_0 - c_s)c_s t} \text{ para } c_0 > c_s \quad \text{Equação 5}$$

Onde  $Q_t$  é a quantidade de fármaco libertado no instante  $t$  por unidade de área,  $M_t$  a quantidade cumulativa absoluta de fármaco libertado no instante  $t$ ,  $A$  a área superficial do dispositivo exposta ao meio de libertação,  $c_0$  é a concentração inicial de fármaco,  $c_s$  a solubilidade do fármaco na matriz e  $D$  a difusividade do fármaco (constante de difusão) na matriz. Esta relação é sempre válida exceto quando a depleção do fármaco no sistema terapêutico é atingida. [70], [71] A equação 5 pode ser expressa como:

$$\frac{M_t}{M_0} = K_H \sqrt{t} \quad \text{Equação 6}$$

Onde  $M_0$  é a quantidade cumulativa absoluta de fármaco libertado no instante infinito (que deverá ser igual à quantidade absoluta de fármaco incorporado no sistema no instante  $t=0$ ) e  $K_H$  é a constante que reflecte as variáveis de projecto do sistema também designada como a constante de dissolução de Higuchi. [68], [71]

O modelo de Higuchi é aplicável na descrição da dissolução de fármacos de diversos tipos de formas de dosagem farmacêutica como sistemas transdérmicos e comprimidos com matrizes onde o fármaco solúvel em água é dispersado. [68] Como se pode verificar a equação do modelo de Higuchi trata-se de um caso especial do modelo de Peppas, isto é, quando  $n=0,5$ .

### 3. Materiais e Métodos

#### 3.1. Reagentes

- $\kappa$ -carragenano (Fluka)
- Ácido cloroáurico (III) trihidratado, pureza  $\geq 99,9\%$  (Aldrich)
- Tiosulfato de sódio (Fisher Chemical)
- Água ultrapura
- Alginato de sódio (Sigma)
- Ácido acético glacial 100% p.a. (Merck)
- Quitosano (Sigma-Aldrich)
- Glicerol
- Cloreto de cálcio anidro  $\text{CaCl}_2$  (Panreac)
- PBS, solução tampão de fosfato salina pH 7.4 (Sigma-Aldrich)
- Azul-de-metileno (Sigma-Aldrich)

#### 3.2. Preparação das Nanopartículas de Ouro estabilizadas em Biopolímero

##### 3.2.1. $\kappa$ -carragenano

As nanopartículas de ouro foram sintetizadas utilizando um método adaptado a partir da referência [9]. Colocaram-se 8 mL de água ultrapura (água UP) num *erlenmeyer* de 50 mL onde se adicionaram 2 mL de solução aquosa de  $\text{HAuCl}_4$  (10mM) e 12 mL de solução aquosa do agente redutor  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  (0,80mM). Colocou-se a solução sob agitação a 700 rpm, e após 9 minutos adicionaram-se mais 2 mL de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  (0,5; 0,65; 0,8 mM). Transcorridos 60 minutos após a segunda adição, adicionaram-se 4 mL de solução de  $\kappa$ -carragenano (5 mg/mL) e deixou-se reagir durante mais 15 minutos, dando por terminada a síntese. A dispersão de nanopartículas foi centrifugada a 10 000 rpm (9,2 g) durante 15 minutos. Retirou-se o sobrenadante, perfez-se o volume com água ultrapura e de seguida redispersou-se a solução com o auxílio de um banho de ultrassons. Esta etapa do procedimento foi realizada duas vezes. [9]

##### 3.2.2. Alginato

A síntese de NPs de ouro estabilizadas com alginato foi realizada utilizando um procedimento idêntico ao descrito anteriormente, adicionando uma solução aquosa de alginato (4 mL, 5 mg/mL) em vez da solução de  $\kappa$ -carragenano.

### 3.3. Preparação de Nanogéis

#### 3.3.1. Nanogéis de $\kappa$ -carragenano/Quitosano

##### 3.3.1.1. Sem Nanopartículas de Au

Inicialmente prepararam-se 100 mL de uma solução aquosa de ácido acético a 1% (v/v), 10 mL de solução de quitosano de 1 mg/mL em ácido acético a 1% (v/v) e 10 mL de solução aquosa de  $\kappa$ -carragenano de 2,5 mg/mL. A síntese dos nanogéis foi feita seguindo o procedimento descrito por Grenha et al. (2010). [33] Resumidamente, colocaram-se 0,8 mL de solução de  $\kappa$ -carragenano 0,5 mg/mL (obtidos por adição de 0,16 mL de solução stock de  $\kappa$ -carragenano 2,5 mg/mL a 0,64 mL de água ultrapura) sob agitação magnética suave (300 rpm) e adicionaram-se 2 mL da solução de quitosano, deixando-se em agitação durante 30 minutos. Posteriormente a solução foi centrifugada a 8000 g durante 30 min e redispersa em água ultrapura (100  $\mu$ L por cada 1,4 mL de solução/tubo *ependorf*). Para evitar a agregação dos nanogéis durante a centrifugação colocou-se uma camada de 10  $\mu$ L de glicerol no fundo de cada tubo *ependorf* antes de centrifugar. [73]

##### 3.3.1.2. Com Nanopartículas de Au

O procedimento para a preparação dos nanogéis compósitos contendo as nanopartículas de Au é semelhante ao anterior, sendo que as nanopartículas de Au foram adicionadas à solução de  $\kappa$ -carragenano, mantendo as condições de concentração e volume das soluções de polímero constantes. A solução de  $\kappa$ -carragenano (0,8 mL, 0,5 mg/mL  $\kappa$ -carragenano), contendo as NPs de Au, foi então obtida por adição de 0,16 mL de solução *stock* de  $\kappa$ -carragenano a 0,2 mL de coloide de NPs de ouro em  $\kappa$ -carragenano e a 0,44 mL de água ultrapura, levando a mistura ao vórtex para que se tornasse homogênea. A síntese foi também realizada utilizando um maior teor de NPs de Au, obtido através da mistura de 0,16 mL de solução *stock* de  $\kappa$ -carragenano a 0,4 mL de coloide NPs de ouro em  $\kappa$ -carragenano e a 0,24 mL de água ultrapura. De notar que, antes da utilização do coloide de NPs de Au (preparado como descrito em 3.2.1) este foi centrifugado a 10 000 rpm (9,2 g) durante 15 minutos e redisperso em igual volume de água ultrapura (operação repetida 2 vezes) com o objetivo de remover o excesso de biopolímero. [73]

#### 3.3.2. Nanogéis de Alginato/Quitosano

##### 3.3.2.1. Sem Nanopartículas de Au

Para esta etapa começou por se preparar 150 mL de solução de 0,063% (m/m) de alginato, 10 mL de solução de  $\text{CaCl}_2$  de 18 mM e 50 mL de solução de quitosano 0,7 mg/mL em ácido acético a 1% (v/v). Todas as soluções foram preparadas usando água ultrapura. A síntese dos nanogéis de alginato/quitosano foi realizada de acordo com o procedimento descrito na literatura. [35] A 58,75 mL da solução de alginato adicionaram-se 3,75 mL da solução de  $\text{CaCl}_2$ , gota-a-gota, durante 60 min, com agitação a 800 rpm. Mediu-se o pH da solução e acertou-se a 4,9 quando necessário. De seguida, adicionaram-se 12,5 mL da solução de quitosano, gota a gota, à solução de alginato, durante 2h, sob agitação a 800 rpm. No final deixou-se em agitação por mais 30 minutos medindo-se o valor do pH final. A separação dos nanogéis foi efetuada por centrifugação, 6000 g

durante 30 minutos colocando previamente 20  $\mu\text{L}$  de glicerol no fundo de cada tubo *eppendorf*. Posteriormente redispersaram-se os nanogéis em água ultrapura (100  $\mu\text{L}$  por casa 1,4 mL de solução/tubo *eppendorf*). [35]

#### 3.3.2.2. Com Nanopartículas de Au

O procedimento para a preparação dos nanogéis compósitos contendo as nanopartículas de Au é semelhante ao anterior, sendo que as nanopartículas de Au foram adicionadas à solução de alginato, mantendo as condições de concentração e volume das soluções de polímero constantes. De notar que o volume da cada *batch* foi reduzido 5 vezes em relação aos volumes usados na preparação nos nanogéis alginato/quitosano sem Au. Adicionaram-se 2,94 mL de NPs de ouro em alginato (depois de centrifugadas e redispersadas em água UP) a 8,81 mL de solução de alginato com concentração de 0,084 % (m/m). Depois de homogeneizar adicionaram-se 0,75 mL de solução de  $\text{CaCl}_2$  (18 mM), gota-a-gota, durante 60 minutos, com agitação a 800 rpm. Mediu-se o pH da solução e acertou-se a 4,9. Confirmou-se por espectroscopia Vis-NIR que este procedimento não afectou as bandas de plasmão das nanopartículas de ouro. Posteriormente adicionaram-se 2,5 mL da solução de quitosano gota-a-gota durante 2 horas com agitação de 800 rpm. Por fim deixou-se a agitar por mais 30 minutos. Mediu-se o pH final e centrifugou-se a solução a 6000 g por 30 minutos, colocando 20  $\mu\text{L}$  de glicerol no fundo de cada tubo *eppendorf*. Posteriormente as nanopartículas redispersaram-se em água ultrapura (100  $\mu\text{L}$  por cada 1,4 mL de solução/tubo *eppendorf*). [35]

### 3.4. Avaliação do Efeito Fototérmico

#### 3.4.1. AuNPs estabilizadas em $\kappa$ -carragenano e Alginato

A avaliação do efeito fototérmico consistiu em expor soluções contendo nanopartículas de ouro estabilizadas em biopolímero ( $\kappa$ -carragenano e alginato) a um laser com comprimento de onda na região NIR (785 nm e potência 450 mW) e monitorizar a temperatura da solução em função do tempo de exposição, para um tempo máximo de 30 minutos. Em cada ensaio colocou-se 1 mL de solução numa célula de quartzo de volume reduzido (capacidade máxima de 1,4 mL). A célula de aquecimento foi colocada a 2 cm da abertura do laser. Para medir a temperatura da solução ao longo da exposição colocou-se um termopar localizado a 1 cm do fundo da célula e a 0,5 cm do feixe do laser como se pode ver na figura 18.

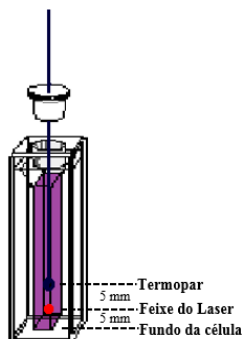


Figura 18-Esquema representativo da célula de aquecimento.

### 3.5. Ensaios de Encapsulação

Os ensaios de encapsulação da molécula modelo azul-de-metileno (AM) foram realizados usando como substratos os nanogéis  $\kappa$ -carragenano/quitosano e Au/ $\kappa$ -carragenano/quitosano. Após a síntese dos nanogéis de  $\kappa$ -carragenano/quitosano e de Au/ $\kappa$ -carragenano/quitosano, estes foram centrifugados a 8000 g durante 30 minutos e depois redispersos em 100  $\mu$ L de água ultrapura com o auxílio do vórtex para não danificar as mesmas. Em cada *ependorf* que continha inicialmente 1,40 mL de solução de nanogéis, adicionou-se 1,40 mL de solução aquosa de AM com concentração de 0,01 mg/mL. Após 48h à temperatura ambiente, centrifugaram-se as amostras durante 30 minutos a 6000 g e guardaram-se e pesaram-se os respectivos sobrenadantes para posterior análise por espectroscopia de UV-Vis a 664 nm. Os nanogéis contendo AM encapsulado foram posteriormente utilizados nos ensaios de libertação. [74] Para determinar a quantidade de AM encapsulada foi ainda necessário determinar a massa de nanogéis presente em cada *ependorf*, o que foi possível após a liofilização das amostras.

### 3.6. Ensaios de Libertação

#### 3.6.1. Sem Exposição a Radiação NIR

O ensaio de libertação é feito imediatamente a seguir ao ensaio de encapsulação. O procedimento foi adaptado da referência [74]. Após a centrifugação dos nanogéis contendo o AM adicionaram-se 50  $\mu$ L de água ultrapura a cada um dos *ependorfs* para, numa fase inicial, facilitar a redispersão das mesmas seguindo-se a agitação no vórtex. Posto isto, transferiu-se toda a amostra para um *vial* de vidro de volume 4 mL e adicionaram-se 3 mL de PBS a 37°C. Considerou-se este momento como o instante inicial ( $t = 0$  min) do ensaio de libertação. O sistema foi mantido a 37°C numa incubadora. Para avaliar a quantidade de AM libertado ao longo do tempo retiraram-se alíquotas de 1 mL da dispersão de 30 em 30 minutos durante as primeiras 2 horas e posteriormente de hora a hora durante 19 h. Cada alíquota foi centrifugada a 8000 rpm (5,9 g) durante 5 minutos e o sobrenadante retirado, pesado e separado para análise por espectroscopia UV-Vis. Os nanogéis depositados no fundo do *ependorf* foram redispersos em 25  $\mu$ L de água ultrapura num vórtex adicionando-se depois PBS a 37°C até perfazer o volume de 1 mL e adicionando-se de seguida a dispersão obtida ao meio de libertação o mais rapidamente possível. [74], [75]

#### 3.6.2. Com Exposição a Radiação NIR

Após a síntese dos nanogéis  $\kappa$ -carragenano/quitosano e  $\kappa$ -carragenano/quitosano/Au (num volume total de 2,8 mL para cada caso) e etapas de encapsulação do AM bem como da centrifugação/redispersão em 100  $\mu$ L de água ultrapura, adicionaram-se 0,78 mL de PBS à temperatura ambiente aos nanogéis resultantes, levando-se ao vórtex para homogeneizar. De seguida, transferiu-se a solução para uma célula de quartzo posicionada a 2 cm da abertura do feixe do laser e realizaram-se exposições durante 15, 30, 45 e 60 minutos em ensaios independentes. Após exposição, centrifugou-se cada uma das amostras durante 5 minutos a 8000 rpm (5,9 g) e guardaram-se os sobrenadantes para posterior análise. Mediu-se também a temperatura da solução ao longo do tempo de exposição.



#### 3.7. Instrumentação

**Espectroscopia de Vis-NIR:** Os espectros de absorção Vis-NIR dos coloides de nanoprismas de ouro foram obtidos usando um espectrofotômetro UV-Vis-NIR Hitachi U-2000. Estas amostras foram colocadas em células de quartzo com um percurso ótico de 10 mm e usou-se água destilada como referência no intervalo 400-1100 nm.

**Espectroscopia de UV-Visível:** Os espectros de absorção de UV-Vis do azul-de-metileno para os ensaios de encapsulação e libertação utilizou-se o espectrofotômetro UV-Vis Cintra 303, utilizando células de quartzo com um percurso ótico de 10 mm e como referência água destilada no intervalo de 400-800 nm.

**Espectroscopia de Infravermelho:** Os espectros de infravermelho obtiveram-se utilizando um espectrofotômetro de infravermelho FT Mattson 7000 e foram adquiridos no intervalo 4000-280  $\text{cm}^{-1}$ , com uma resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$  e 128 varrimentos. As amostras foram previamente secas na estufa a 70°C durante uma noite e posteriormente reduzidas a pó, sendo depois adicionado KBr para formar as respectivas pastilhas.

**Diâmetro Hidrodinâmico (DLS) e Potencial Zeta:** O diâmetro hidrodinâmico, o índice de polidispersividade e o potencial zeta das nanopartículas, quer de biopolímero quer de ouro e das soluções envolvidas nas sínteses foram medidos usando um equipamento Zetasizer® Nano ZS da Malvern Instruments. As análises foram realizadas em triplicado a 25 °C com um ângulo de detecção 173°. O potencial zeta foi medido utilizando células descartáveis após medição dos respetivos pH. Para soluções e dispersões mais concentradas fizeram-se diluições com água ultrapura.

**Microscopia Eletrónica:** A morfologia das nanopartículas de ouro e biopolímero foram analisadas usando um microscópio eletrónico de varrimento Hitachi SU70 operado a 15kV, e um microscópio eletrónico de transmissão (TEM), Hitachi H-9000 operado a 300kV. Para a preparação das amostras utilizaram-se grelhas de cobre revestidas com um filme de carbono. As grelhas foram mergulhadas em soluções aquosas diluídas contendo as amostras e deixadas a secar à temperatura ambiente antes de efetuar a análise.

**Calorimetria Diferencial de Varrimento (DSC):** As propriedades térmicas das nanopartículas de biopolímero foram estudadas por DSC utilizando um calorímetro Shimadzu DSC-50. Em cada ensaio foram colocados aproximadamente 10 mg de amostra em porta-amostras de alumínio, tendo-se efetuado um varrimento de 20 a 80°C, à velocidade de aquecimento de 2°C/min.

**Difração de Raios-X (DRX):** O difractograma de raios-X das amostras preparadas foi obtido num difractómetro de raios-x PANalytical Empyrean equipado com uma fonte de radiação monocromática Cu-K $\alpha$ .

**Liofilizador:** As amostras previamente congeladas foram liofilizadas utilizando um liofilizador Telstar LyoQuest a -85°C e 0,01 mbar.

**Medidor de pH:** As medições de pH foram efetuadas utilizando o equipamento Consort C861 calibrado com soluções padrão de pH=4 e pH=7 à temperatura ambiente.

### 3. Materiais e Métodos

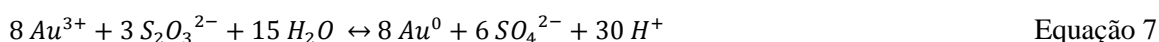
**Incubadora:** Parte dos ensaios de liberação foram realizados numa mini incubadora Labnet a 37°C e num agitador orbital IKA KS 4000 i control a 37°C sem agitação.

**Laser:** A avaliação do efeito fototérmico das AuNPs e os ensaios de liberação de AM foram efetuados com um laser a 785 nm com potência de 450 mW.

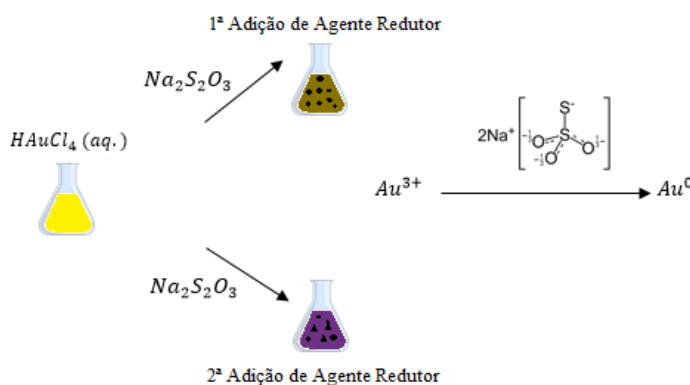
## 4. Resultados Experimentais e Discussão

### 4.1. Preparação de Nanoprismas de Ouro

A primeira etapa do trabalho consistiu na síntese e caracterização físico-química de nanoprismas de ouro, que posteriormente foram usados como fase dispersa na preparação de nanogéis compósitos (secção 4.2). Numa fase inicial procedeu-se à otimização do procedimento de síntese de modo a obter nanopartículas com as propriedades pretendidas, nomeadamente absorção máxima na zona espectral dos 800 nm e morfologia triangular plana. Posteriormente procedeu-se à estabilização das nanopartículas utilizando os biopolímeros  $\kappa$ -carragenano e alginato. O método de síntese utilizado consiste na redução do ácido cloroáurico ( $\text{HAuCl}_4$ ) por ação do agente redutor, tiosulfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) e é descrito pela equação 7. [9]



Na figura 19 apresenta-se uma representação esquemática da síntese destas nanopartículas. A uma solução aquosa de ácido cloroáurico (III) adiciona-se uma solução aquosa de tiosulfato de sódio (1ª adição) que atua como agente redutor e promove a formação de sementes, que posteriormente funcionarão como núcleos de crescimento das NPs, na ausência de tensioativo. A 2ª adição de agente redutor, é essencial à proliferação das sementes e consequentemente das NPs de ouro. Como cada etapa de síntese apresenta colorações distintas, tornando possível através dos seus respetivos espectros de UV-Vis, acompanhar o processo da síntese bem como a morfologia das NPs.



**Figura 19 - Representação esquemática das etapas da síntese dos nanoprismas triangulares de ouro.**

A síntese foi efetuada utilizando soluções de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  de concentração variável (0,5; 0,65 e 0,8 mM). Os espectros de absorção (Figura 20) mostram que a concentração do agente redutor influencia as propriedades óticas das NPs finais. Sendo que, utilizando uma solução com a concentração de 0,8 mM foi possível preparar Au NPs com banda de plasmão mais próxima de 800 nm, tal como se pretendia.

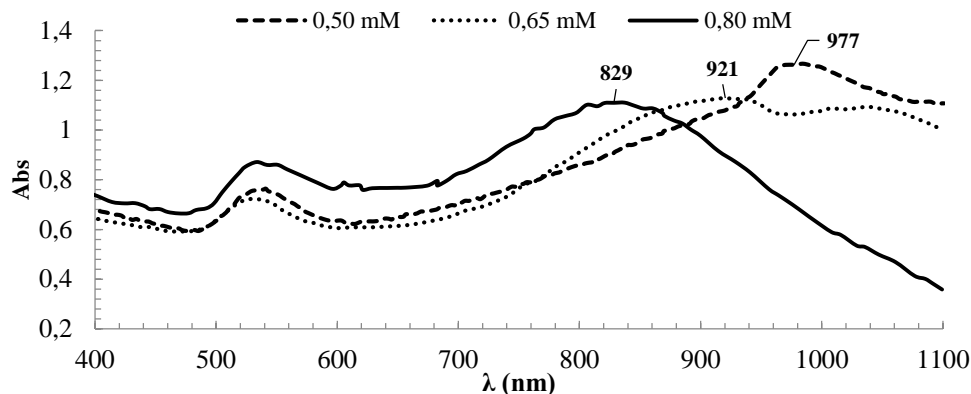


Figura 20 - Espectros de absorção Vis-NIR de suspensões de AuNPs obtidas variando a concentração do agente redutor ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) após aproximadamente 1h de reação.

#### 4.1.1. Nanoprismas de Ouro estabilizados em $\kappa$ -carragenano

##### 4.1.1.1. Propriedades Óticas

Os espectros de absorção Vis-NIR das soluções coloidais foram usados como uma das formas de verificar a presença de nanoprismas de ouro nas amostras, mas também permitiu monitorizar a estabilidade coloidal das mesmas ao longo do período de armazenamento.

Durante a síntese, foi monitorizado o comportamento da banda de plasmão da solução de nanopartículas de ouro de 15 em 15 minutos usando um espectrofotômetro UV-Vis-NIR (Figura 21). Após 60 minutos de reação adicionou-se o biopolímero de modo a aumentar a estabilidade coloidal evitando a agregação das nanopartículas. Por fim, após 75 minutos de reação, centrifugou-se e redispersou-se toda a solução com o objetivo de se eliminar os resíduos de reagentes bem como alguns produtos secundários (sais).

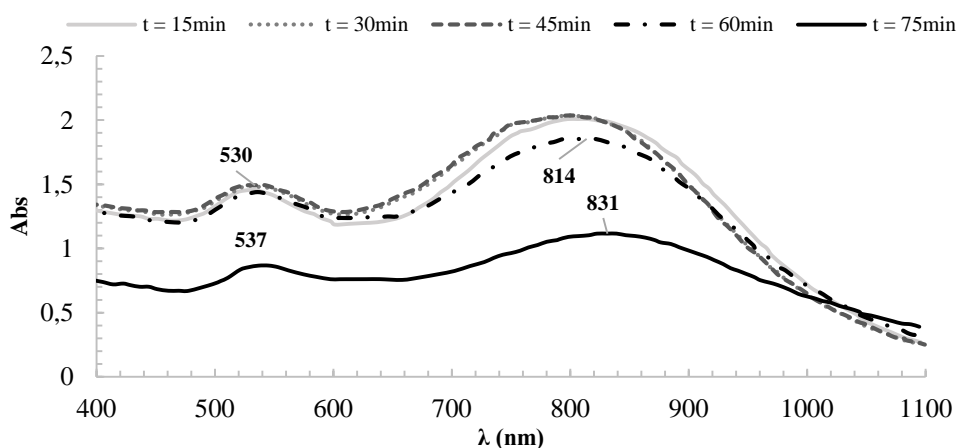
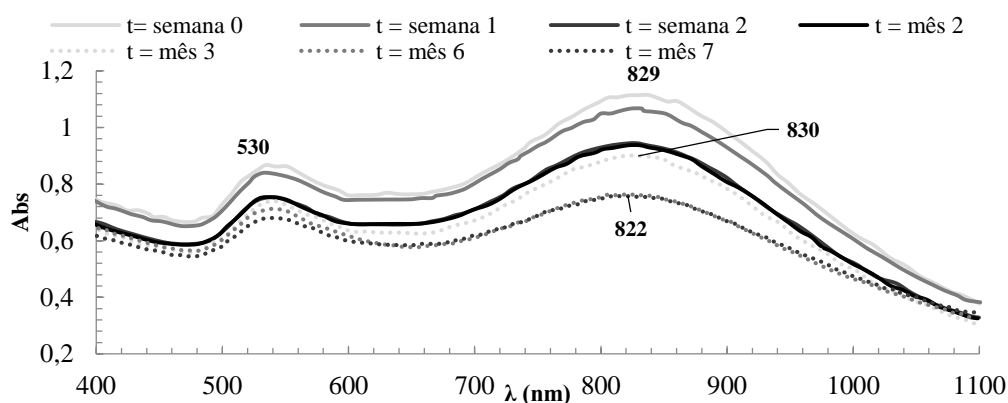


Figura 21 – Monitorização da banda de plasmão da solução de nanopartículas de ouro por espectroscopia VIS-NIR antes e após a adição de  $\kappa$ -carragenano. Os espectros apresentados para  $t = 15$  e  $30$  min correspondem ao coloide após 15 minutos e 30 min da 2ª adição de agente redutor, os  $t = 45$  e  $60$  min correspondem aos momentos antes e após a adição de biopolímero, e por último  $t = 75$  min é o momento após a centrifugação e redispersão do coloide.

Através da figura 21 pode verificar-se que há um ligeiro desvio da banda de plasmão longitudinal para comprimentos de onda maiores com o decorrer da síntese. Ao adicionar-se o biopolímero nota-se um decréscimo de intensidade das bandas enquanto o comprimento de onda se desloca ligeiramente para 814 nm

e ao centrifugar-se e redispersar-se a solução verifica-se também um decréscimo da intensidade das bandas bem como um deslocamento da banda de absorção longitudinal do valor de 814 nm para 831 nm. Por outro lado, a banda de plasmão transversal mantém-se praticamente constante nos 530 nm nos primeiros 45 minutos mas após a adição de biopolímero esta desvia-se para os 537 nm mantendo-se constante até ao final da reação. Em relação à intensidade, esta diminui após as etapas de adição de biopolímero e de lavagem. O desvio da banda longitudinal para maiores comprimentos de onda pode dever-se à interação das AuNPs com o polímero mas também ao aumento do comprimento das arestas dos nanoprismas enquanto a sua espessura se mantém constante. [9] De modo a monitorizar a estabilidade da solução das nanopartículas foram realizados espectros semanalmente, durante cerca de 7 meses, como se pode observar na figura 22.

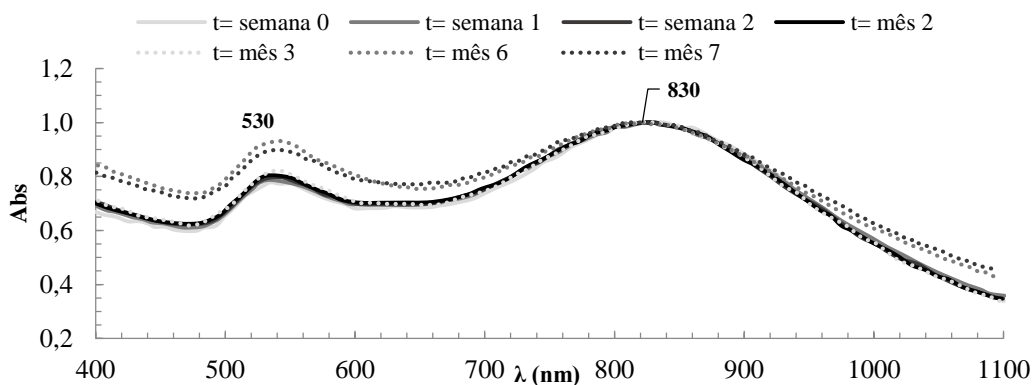


**Figura 22 – Espectros de absorção UV-Vis-NIR de monitorização da estabilidade da dispersão de nanopartículas de ouro em  $\kappa$ -carragenano.**

Como se pode observar na figura 22, ao longo do tempo observa-se uma diminuição da intensidade da banda longitudinal em relação à banda transversal. Além da diminuição da intensidade das bandas, é possível constatar também um pequeno desvio da banda de plasmão longitudinal para menores comprimentos de onda. As bandas de absorção da amostra em torno dos 530 e os 820 nm confirmam a existência de partículas nanoesferóides e nanoprismas de ouro. A banda em torno dos 530 nm corresponde à banda de plasmão transversal dos nanoprismas, mas também das nanoesferas enquanto a de 820 nm corresponde à banda de plasmão longitudinal dos nanoprismas. A maioria dos procedimentos de síntese coloidal de nanoprismas de ouro em fase líquida tendem a produzir uma pequena percentagem de NPs esferóides assim como nanodiscos ou nanoprismas triangulares sem pontas. A diminuição da intensidade das bandas de plasmão deve-se provavelmente à adsorção de NPs ao recipiente, o que pode conduzir a uma menor concentração as mesmas em solução. O desvio da banda longitudinal para menores comprimentos de onda ao longo do tempo de armazenamento pode indicar mudanças na morfologia dos nanoprismas triangulares, nomeadamente a diminuição da razão entre o comprimento da aresta e a espessura dos nanoprismas. Nesse caso os nanoprismas passariam de uma estrutura ideal, com três arestas concorrentes, para uma estrutura de pontas truncadas ou até mesmo nanodiscos. [9]

De modo a averiguar o impacto do tempo de armazenamento na estabilidade da dispersão de nanoprismas de ouro em  $\kappa$ -carragenano normalizaram-se os seus espectros de absorção em relação à banda longitudinal (800 nm), como se pode verificar na figura 23. A observação destes espectros indica que, ao longo

do período de armazenamento deste coloide, a proporção de NPs de morfologia esférica aumenta em relação à de nanoprismas. Esta mudança observável nos espectros de absorção pode dever-se à alteração da morfologia das nanopartículas.



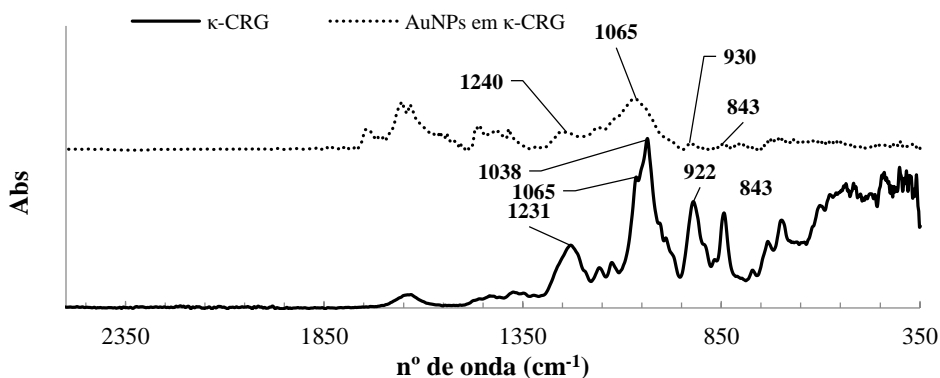
**Figura 23 – Espectros de absorção UV-Vis-NIR de monitorização da estabilidade da dispersão de nanopartículas de ouro em  $\kappa$ -carragenano normalizados.**

Para certificar a indicação de alteração de morfologia por parte de espectroscopia Vis-NIR analisou-se o coloide por microscopia eletrónica obtendo-se as imagens A e B presentes na figura 48 do anexo 1. Como se pode observar alguns dos nanoprismas de ouro apresentam pontas truncadas tal como sugeriam os espectros Vis-NIR.

#### 4.1.1.2. Composição Química

##### *Espectroscopia de IV*

A análise dos espectros de IV (Figura 24) permitiu confirmar a presença do  $\kappa$ -carragenano usado na síntese das nanopartículas de ouro como estabilizante do coloide.

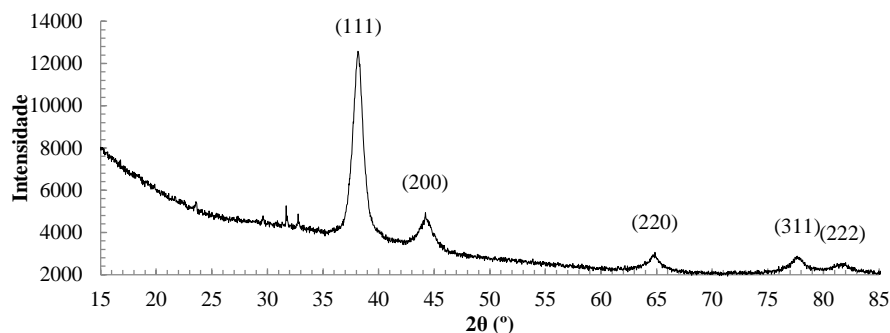


**Figura 24 - Espectros de IV (em modo de absorvância) do  $\kappa$ -CRG e das AuNPs em  $\kappa$ -CRG.**

No espectro do coloide de AuNPs é possível identificar a presença de uma banda a  $1231\text{ cm}^{-1}$ , correspondente à banda de vibração da elongação da ligação assimétrica do S-O característico dos grupos sulfato do carragenano, a  $1065\text{ cm}^{-1}$  correspondente à banda de vibração das ligações C-OH, e também pequenas contribuições das bandas a  $922$  e  $843\text{ cm}^{-1}$  correspondentes 3,6-anidrogactose e à vibração da elongação da ligação C-O-S da  $\alpha(1-3)$ -D-gactose do  $\kappa$ -carragenano, respetivamente. [33], [69], [76]

### Difração de Raios-X (DRX)

A técnica de difração de raios-X é usada para determinar a composição de materiais cristalinos. No presente trabalho, este método foi utilizado como forma de comprovar a existência de ouro na amostra através da existência das fases cristalinas deste na mesma. O difratograma de DRX da amostra encontra-se na figura 25.



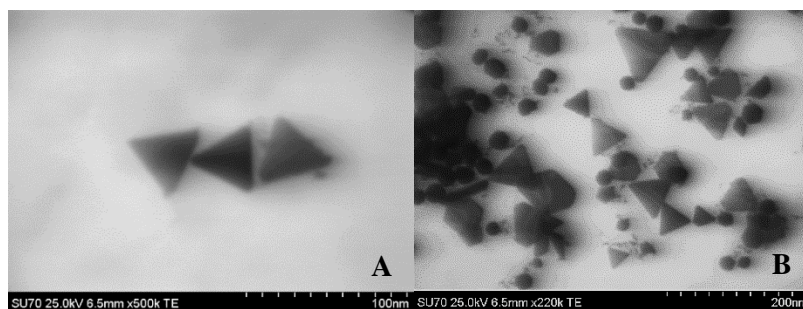
**Figura 25 - Difratograma de raios-X das nanopartículas de ouro estabilizadas em  $\kappa$ -carragenano.**

Os picos de difração observados a  $2\theta=38,2^\circ$ ,  $44,2^\circ$ ,  $64,9^\circ$ ,  $77,7^\circ$  e  $81,7^\circ$  correspondem, respetivamente, aos diferentes planos cristalinos, (111), (200), (220), (311) e (222), da estrutura cúbica do ouro. Estes valores estão de acordo com o que é descrito na literatura (anexo 2). Desta forma é possível afirmar que a amostra preparada possui ouro visto que apresenta os picos de difração característicos da sua estrutura cúbica.

#### 4.1.1.3. Morfologia e Carga Superficial

##### Microscopia Eletrónica

Através das imagens de microscopia eletrónica de varrimento (em modo de transmissão) (STEM) e de um *software* apropriado, o ImageJ, contabilizaram-se as nanopartículas existentes na amostra bem como as suas dimensões. As figuras 26.A e B mostram nanoprismas e nanoesferas de ouro com  $\kappa$ -carragenano em pormenor.



**Figura 26.A e B – Imagens de STEM dos nanoprismas e nanoesferas de ouro presentes na amostra.**

Após a contagem e medição do maior número possível de nanopartículas nesta amostra realizaram-se os respetivos histogramas. Em anexo (Figuras 50 e 51 do anexo 3) apresentam-se os histogramas que descrevem a distribuição dos comprimentos da aresta e diâmetros dos nanoprismas e nanoesferas de ouro. Os nanoprismas apresentam um comprimento médio de aresta de  $55,0\pm 16,9$  nm enquanto as nanoesferas apresentam um diâmetro de  $20,0\pm 4,20$  nm. Como se pode verificar ainda existe um número elevado de nanoesferas na amostra. Na tentativa de diminuir o número de nanoesferas e concentrar a amostra em

nanoprismas, centrifugou-se a mesma a 8000 rpm durante 20 minutos, retirou-se o sobrenadante e perfez-se o volume com água ultrapura redispersando de seguida tal como sugerido na referência [9]. No entanto este procedimento não resultou num aumento significativo da intensidade da banda de plasmão longitudinal pelo que se conclui que o enriquecimento não foi eficaz.

### ***Diâmetro Hidrodinâmico (DLS) e Potencial Zeta ( $\zeta$ )***

Os valores de diâmetros hidrodinâmicos e os potenciais zeta das nanopartículas de ouro dispersas em  $\kappa$ -carragenano encontram-se na tabela 5. Na tabela 11 do anexo 3 podem ver-se os resultados de potencial zeta e diâmetro hidrodinâmico da solução aquosa de  $\kappa$ -carragenano utilizada como estabilizante do coloide de AuNPs.

**Tabela 5 – Potencial zeta e diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas de ouro estabilizadas em  $\kappa$ -carragenano.**

Amostra	pH	T (°C)	$\zeta$ (mV)	Z-Average (nm)	PDI
AuNPs em $\kappa$ -CRG	7,3	25	-31,5 $\pm$ 1,4	122 $\pm$ 13	0,47 $\pm$ 0,02

A carga superficial dos nanoprismas (potencial zeta) é negativa o que sugere que existem moléculas de  $\kappa$ -carragenano, polímero aniónico, na superfície das nanopartículas. O diâmetro hidrodinâmico nas nanopartículas (Z-average) é significativamente superior ao valor observado por microscopia o que pode ser atribuído à presença de cadeias de polímero na superfície das nanopartículas. O valor do índice de polidispersividade (Pdi) é também elevado (superior a 0,3) o que indica que a amostra é polidispersa. De notar o facto de as nanopartículas apresentarem forma anisotrópica bem como a amostra ser constituída por uma mistura de morfologias poderá afetar também o resultado do diâmetro hidrodinâmico. [77]

## **4.1.2. Nanoprismas de Ouro estabilizados em Alginato**

### **4.1.2.1. Propriedades Óticas**

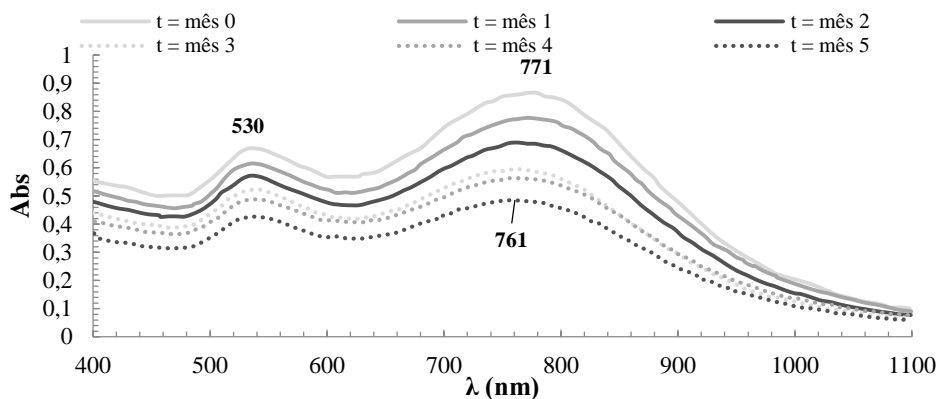
À semelhança do efetuado com o  $\kappa$ -carragenano, os espectros de absorção do coloide de ouro em alginato também foram usados para confirmar a existência de nanoprismas de ouro nas dispersões, e também para monitorizar a sua estabilidade ao longo do período de armazenamento.

A estabilidade da dispersão em causa foi monitorizada ao longo do tempo da mesma forma que a dispersão do outro sistema em estudo. Os espectros de absorção encontram-se representados na figura 27, onde se observa uma diminuição da intensidade da absorvância ao longo do tempo de armazenamento por parte da dispersão de nanopartículas. Porém verificou-se que esta se mantinha estável durante 5 meses. Tal como referido anteriormente, para o caso do  $\kappa$ -carragenano, este fenómeno pode dever-se ao facto de se formarem depósitos de nanopartículas na amostra ao longo do período de armazenamento.

À semelhança do coloide de ouro estabilizado com  $\kappa$ -carragenano, este apresenta as mesmas duas bandas de plasmão em torno dos 530 e perto dos 800 nm. Estas bandas correspondem à banda de plasmão transversal dos nanoprismas mas também das nanoesferas e à banda de plasmão longitudinal dos nanoprismas, respetivamente. Tendo em conta que as nanopartículas de ouro são sintetizadas da mesma forma, mas

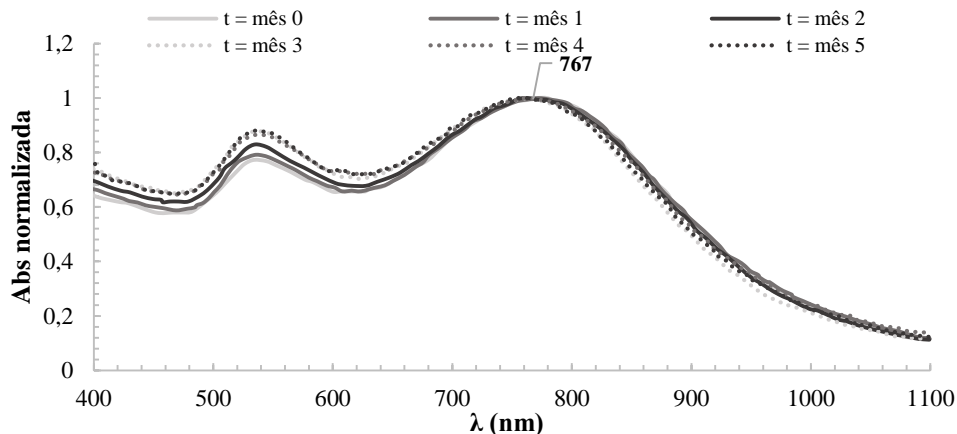


estabilizadas com biopolímeros diferentes, verifica-se inevitavelmente a presença de nanopartículas esféricas, discos, triangulares sem pontas além dos nanoprismas esperados. [9]



**Figura 27 - Espectros de absorção UV-Vis-NIR de monitorização da estabilidade da dispersão de nanopartículas de ouro em alginato.**

Da mesma forma que foi feito para o coloide em  $\kappa$ -carragenano, para averiguar o impacto do tempo de armazenamento na estabilidade da dispersão de nanoprismas de ouro em alginato normalizaram-se os seus espectros de absorção em relação à banda de plasmão longitudinal (800 nm). A análise da figura 28 permite verificar que, tal como observado para os nanoprismas estabilizados em  $\kappa$ -carragenano, ao longo do tempo de armazenamento a proporção de nanopartículas esféricas aumenta em relação à de nanoprismas. A aproximação das intensidades das bandas de plasmão transversal e longitudinal longo do tempo de armazenamento pode indicar alteração da morfologia das nanopartículas.



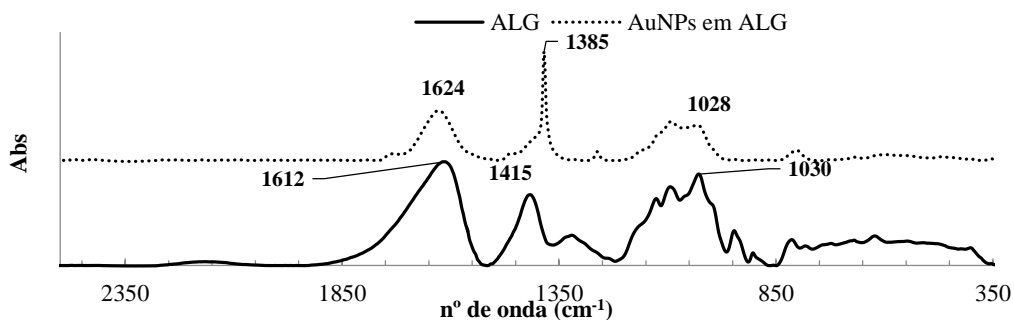
**Figura 28 - Espectros de absorção UV-Vis-NIR de monitorização da estabilidade da dispersão de nanopartículas de ouro em alginato normalizados.**

De forma a averiguar a ocorrência de uma possível alteração de morfologia dos nanoprismas sugerida por espectroscopia Vis-NIR analisou-se o coloide por microscopia eletrónica (Figura 49, anexo 1). A partir das figuras em anexo é possível verificar o que foi sugerido por espectroscopia de Vis-NIR, a morfologia dos nanoprismas de ouro foi-se alterando ao longo do tempo assumindo a forma de nanodiscos com vértices arredondados ou cortados.

#### 4.1.2.2. Composição Química

##### *Espectroscopia de IV*

O coloide de ouro estabilizado com alginato foi também analisado por espectroscopia de IV por forma a averiguar a presença do biopolímero. Na figura 29 apresenta-se o espectro de IV do biopolímero e da amostra em simultâneo.



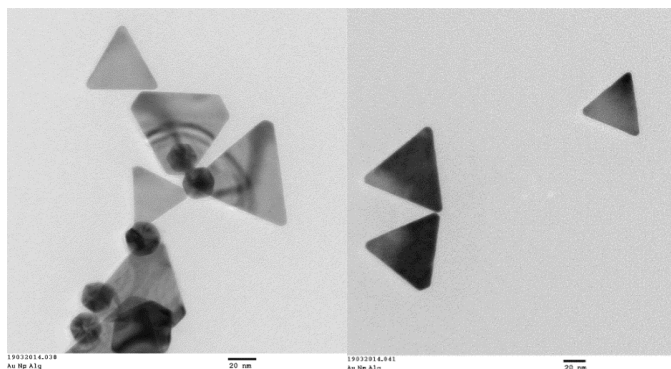
**Figura 29 - Espectros de IV (em modo de absorvância) do ALG e das AuNPs em ALG.**

Analisando o espectro apresentado na figura 29 pode afirmar-se que a amostra de coloide de ouro contém alginato, pois apresenta as principais bandas características deste biopolímero. A cerca dos 1624 e 1385  $\text{cm}^{-1}$  (1612 e 1415  $\text{cm}^{-1}$  no alginato) correspondentes aos grupos carbonilo do alginato e às vibrações assimétrica e simétrica da elongação do  $\text{COO}^-$ , respetivamente. Por último apresentam também uma banda por volta dos 1028  $\text{cm}^{-1}$  (1030  $\text{cm}^{-1}$  no alginato) que corresponde às vibrações da elongação assimétrica C-O-C. Os desvios das bandas podem dever-se à interação destes grupos característicos com a superfície metálica das nanopartículas. [78]

#### 4.1.2.3. Morfologia e Carga Superficial

##### *Microscopia Eletrónica*

As nanopartículas em alginato foram também analisadas por microscopia eletrónica de transmissão (TEM) e com o programa ImageJ analisaram-se as suas dimensões e número. Na figura 30 podem observar-se os nanoprismas de ouro presentes nesta amostra.



**Figura 30 – Imagens de TEM dos nanoprismas de ouro da amostra em alginato.**

O valor médio da aresta dos nanoprismas foi de  $57,4 \pm 16,8$  nm enquanto o diâmetro das nanopartículas esféricas foi de  $22,2 \pm 4,30$  nm. Em anexo (Figuras 52 e 53, anexo 3) apresentam-se os histogramas dos resultados obtidos.

### ***Diâmetro Hidrodinâmico (DLS) e Potencial Zeta ( $\zeta$ )***

A tabela 6 diz respeito às medições de potencial zeta e diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas dispersas em alginato. No anexo C, na tabela 11, podem encontrar-se os resultados de potencial zeta e diâmetro hidrodinâmico da solução aquosa de alginato usada para estabilizar o coloide.

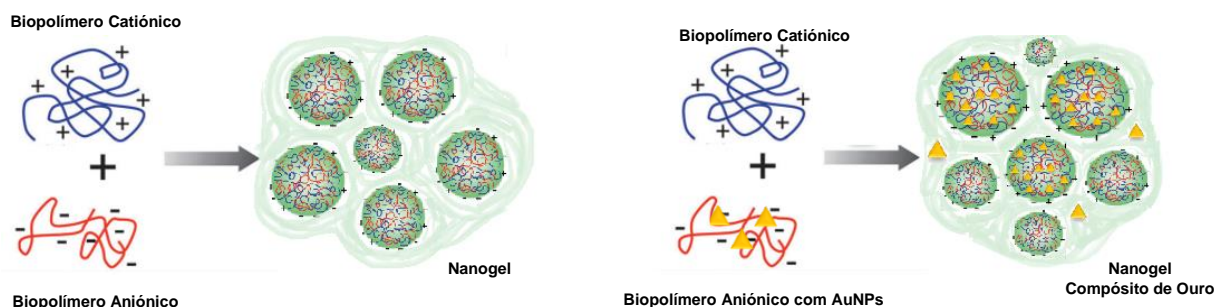
**Tabela 6 – Potencial zeta e diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas de ouro estabilizadas em alginato.**

Amostra	pH	T (°C)	$\zeta$ (mV)	Z-Average (nm)	PDI
AuNPs em ALG	6,5	25	$-36,1 \pm 0,8$	$77,0 \pm 13,0$	$0,49 \pm 0,03$

Os valores de potencial zeta dos nanoprismas de Au são negativos o que está de acordo com a presença do alginato na superfície das nanopartículas, conferindo-lhe carga superficial negativa.

## **4.2. Preparação de Nanogéis Compósitos de Ouro**

Os nanogéis compósitos foram preparados adicionando uma solução coloidal de nanoprismas de ouro estabilizados com um polissacarídeo aniônico ( $\kappa$ -carragenano ou alginato) a uma solução contendo quitosano, um polissacarídeo catiônico. A formação de nanopartículas de hidrogel é esperada devido à interação electrostática entre os dois polissacarídeos com cargas opostas (Figura 31).



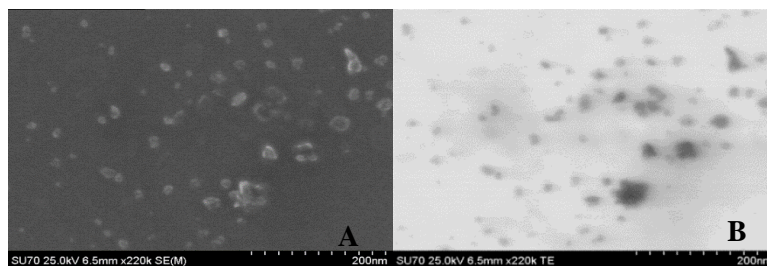
**Figura 31 - Mecanismo proposto para a formação de nanogéis por complexação polieletrólítica. [Adaptado de [79]]**

### **4.2.1. Nanogéis de $\kappa$ -carragenano/Quitano contendo Nanoprismas de Ouro**

#### **4.2.1.1. Morfologia e Carga Superficial**

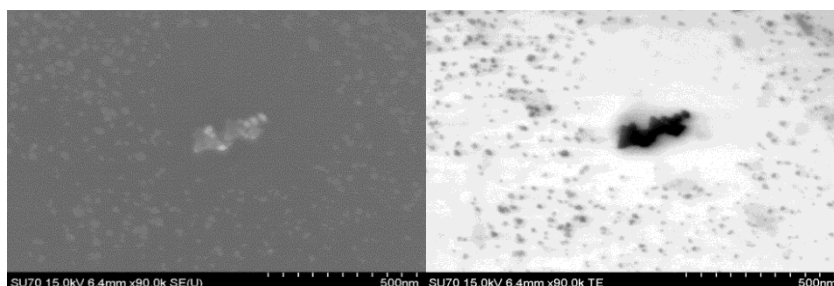
##### ***4.2.1.1.1. Microscopia Eletrônica***

Da mesma forma que os nanoprismas de ouro, também se analisaram os nanogéis de  $\kappa$ -CRG/QUT por microscopia. Foram analisadas amostras de nanogel sem e com nanopartículas de ouro encapsuladas. Nas figuras 32.A e B. podem observar-se as nanopartículas de  $\kappa$ -CRG/QUT que compõem o nanogel.



**Figura 32 – Imagens de SEM (A) e STEM (B) do nanogel de  $\kappa$ -CRG/QUT sem AuNPs.**

Em relação aos nanogéis compósitos de ouro, foram preparadas duas amostras contendo duas quantidades de ouro diferentes. Assumindo que não houve perdas significativas de nanopartículas de ouro durante as várias etapas de síntese e lavagem, o teor de ouro nos nanogéis é de 2,93 e 3,73 % (m/m) para as amostras  $\kappa$ -CRG/QUT/Au1 e  $\kappa$ -CRG/QUT/Au2, respetivamente. Por sua vez, estas amostras foram também analisadas por microscopia eletrónica, com o intuito de comparar os diferentes teores de ouro entre si bem como o nanogel. Na figura 33 mostram-se imagens SEM/STEM da amostra de nanogel com menor teor de AuNPs.



**Figura 33 – Imagens de SEM (A) e STEM (B) da amostra de nanogel com menos AuNPs,  $\kappa$ -CRG/QUT/Au1.**

Como se pode observar na figura 33, a maioria da amostra é constituída por NPs  $\kappa$ -CRG/QUT enquanto as AuNPs encapsuladas se encontram dispersas em pequenos agregados. Na figura 34 apresentam-se imagens do nanogel com maior teor de ouro,  $\kappa$ -CRG/QUT/Au2.



**Figura 34 – Imagens de SEM (A e B) e STEM (C) do nanogel com mais AuNPs,  $\kappa$ -CRG/QUT/Au2.**

Analisando as imagens da figura 34, pode verificar-se que existem menos nanopartículas de hidrogel sem AuNPs distribuídas pela amostra, no entanto pode verificar-se a presença de pequenos agregados de AuNPs em  $\kappa$ -CRG/QUT em maior quantidade.

Como era esperado, verifica-se que os nanogéis  $\kappa$ -CRG/QUT/Au2 apresentam mais AuNPs encapsuladas, visto que no decorrer da sua síntese foi utilizada uma maior quantidade de ouro. Por outro lado, pode verificar-se também que em ambas formulações,  $\kappa$ -CRG/QUT/Au1 e  $\kappa$ -CRG/QUT/Au2, os nanoprismas de ouro encapsulados tendem a formar agregados. A formação destes agregados pode dever-se a duas coisas,

à ausência de um estabilizante mais eficaz na preparação das nanopartículas de ouro ou à sensibilidade destas a mudanças no meio onde estão inseridas.

### ***Diâmetro Hidrodinâmico e Potencial Zeta***

Para confirmar que as soluções de  $\kappa$ -carragenano e quitosano apresentavam cargas opostas, mediu-se o potencial zeta ( $\zeta$ ) destas soluções, nas condições de pH usadas na síntese. Obtiveram-se os valores de  $\zeta = -54,5 \pm 6,8$  mV a pH=6,2 para a solução de  $\kappa$ -carragenano e de  $\zeta = 55,4 \pm 4,3$  mV a pH=3,0 para a solução de quitosano, confirmando que poderá ocorrer interação electrostática entre os dois polissacarídeos. A análise das soluções de  $\kappa$ -CRG (0,5 mg/mL) e de QUT (1 mg/mL) em ácido acético a 1% (v/v) indica um diâmetro de aproximadamente 1 e 2 nm, respetivamente, que podem ser atribuídos à contribuição das cadeias de polímero presentes nas mesmas. Após a síntese observa-se um diâmetro na ordem dos 1300 nm que sugere a formação das nanopartículas de hidrogel (nanogéis). No anexo 3, na figura 54.1, encontra-se a evolução do diâmetro hidrodinâmico ao longo da síntese dos nanogéis. Na tabela 12 encontram-se os resultados de potencial zeta e diâmetro hidrodinâmico das soluções precursoras dos nanogéis.

Os valores de diâmetro hidrodinâmico e de potencial zeta dos nanogéis com e sem nanopartículas de ouro apresentam-se na tabela 7. No caso das medidas de diâmetro hidrodinâmico os índices de polidispersividade (PDI) das amostras são, de um modo geral, superiores a 0,30, indicando que a amostra é polidispersa o que contribui para a discrepância entre o valor do diâmetro hidrodinâmico em número e o Z-average.

Os nanogéis de  $\kappa$ -CRG/QUT apresentam um diâmetro hidrodinâmico (Z-Average) de  $1322 \pm 275$  nm (em número de  $193 \pm 45$  nm) e uma carga superficial de  $+80,5 \pm 1,4$  mV. O diâmetro hidrodinâmico destes nanogéis após centrifugação apresenta-se mais próximo do valor descrito na literatura,  $768 \pm 392$  nm (Z-Average) e  $564 \pm 108$  nm (em número). [33]

A carga das NPs de  $\kappa$ -CRG/QUT é positiva indicando que o quitosano se encontre distribuído à superfície das mesmas. A carga superficial dos nanogéis contendo nanopartículas de ouro é positiva ( $\zeta \sim 68$  mV), o que está de acordo com o indicado na literatura para nanogéis de  $\kappa$ -CRG/QUT preparados utilizando esta metodologia. [33]

**Tabela 7 – Potencial zeta e diâmetro hidrodinâmico dos nanogéis de  $\kappa$ -CRG/QUT sem e com AuNPs.**

Amostra de nanogéis	pH	$\zeta$ (mV)	$d_{\text{número}}$ (nm)	Z-Average (nm)	PDI
$\kappa$ -CRG/QUT*	3,0	$+80,5 \pm 1,4$	$193 \pm 45$	$1322 \pm 275$	$0,73 \pm 0,23$
$\kappa$ -CRG/QUT**	3,8	$+75,0 \pm 0,7$	$564 \pm 108$	$768 \pm 392$	$0,59 \pm 0,36$
<b>1</b>					
$\kappa$ -CRG/QUT/Au1*	3,1	$67,8 \pm 1,1$	$135 \pm 96$	$438 \pm 19$	$0,49 \pm 0,09$
$\kappa$ -CRG/QUT/Au1**	3,5	$68,8 \pm 0,8$	$66 \pm 11$	$433 \pm 13$	$0,44 \pm 0,07$
<b>2</b>					
$\kappa$ -CRG/QUT/Au2*	3,2	$68,1 \pm 1,3$	$85,9 \pm 21$	$540 \pm 10$	$0,56 \pm 0,02$
$\kappa$ -CRG/QUT/Au2**	3,9	$71,3 \pm 0,8$	$257 \pm 194$	$383 \pm 40$	$0,46 \pm 0,04$

\* após a síntese, sem centrifugar; \*\* após centrifugação e redispersão em água UP

As NPs de  $\kappa$ -CRG/QUT com AuNPs não apresentam grande diferença no que diz respeito ao valor da carga superficial quer na formulação de  $\kappa$ -CRG/QUT/Au1 como na  $\kappa$ -CRG/QUT/Au2, visto que a única

alteração é a concentração de ouro mantendo-se a concentração de polímero constante. O diâmetro hidrodinâmico (Z-Average) diminui significativamente nos nanogéis contendo ouro, para valores entre 430 e 540 nm. Os diâmetros hidrodinâmicos dos nanogéis compósitos de ouro obtidos estão de acordo com os resultados descritos na literatura, pois estão próximos dos 500 nm. No que diz respeito ao potencial zeta, os nanogéis apresentam também valores concordantes com os relatados na literatura pois são positivos e encontram-se próximos dos + 60 mV. [33] A diminuição do diâmetro hidrodinâmico (Z-Average) que se verifica após a centrifugação das NPs do hidrogel  $\kappa$ -CRG/QUT compósito de ouro pode dever-se a alguma deterioração do material provocado por esta etapa de lavagem.

#### 4.2.1.2. Propriedades Óticas

Com vista a averiguar se os nanocompósitos sintetizados possuíam as propriedades óticas das nanopartículas de ouro realizaram-se espectros Vis-NIR. A síntese de NPs de  $\kappa$ -CRG/QUT com AuNPs foi realizada para duas quantidades de ouro diferentes, uma com menor e outra com maior concentração de nanopartículas de ouro,  $\kappa$ -CRG/QUT/Au1 e  $\kappa$ -CRG/QUT/Au2, respetivamente. A figura 34 mostra os espectros de Vis-NIR destas duas amostras. A amostra  $\kappa$ -CRG/QUT/Au2, como seria de esperar, apresenta uma maior absorvância devido à maior quantidade de ouro presente.

Através da figura 35 pode também verificar-se que os nanogéis compósitos,  $\kappa$ -CRG/QUT/Au1 e  $\kappa$ -CRG/QUT/Au2, apresentam as mesmas duas bandas de plasmão presentes no espectro dos nanoprismas. Estas bandas situam-se por volta dos 537-538 nm e dos 831-836 nm, correspondentes às bandas de plasmão transversais das nanoesferas e nanoprismas e à banda de plasmão longitudinal dos nanoprismas de ouro, respetivamente.

Ao analisar os espectros em simultâneo verifica-se que a banda de plasmão transversal não se altera significativamente, mantendo-se aproximadamente em torno dos 540 nm. Enquanto a banda longitudinal, se deslocou aproximadamente 10 nm, passando dos 821 nm no coloide de nanoprismas para os 831/836 nm nos hidrogéis nanocompósitos.

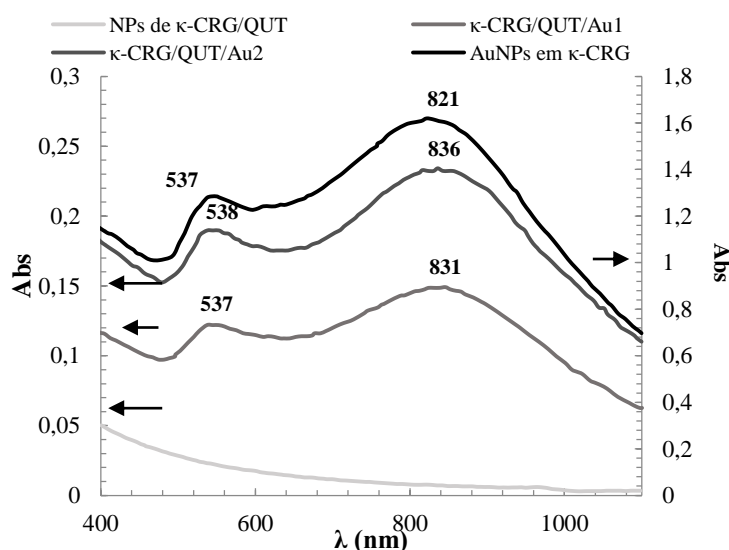


Figura 35 - Espectros Vis-NIR dos coloides dos nanogéis de  $\kappa$ -CRG/QUT/Au e do coloide de nanoprismas de Au usados nestas sínteses.

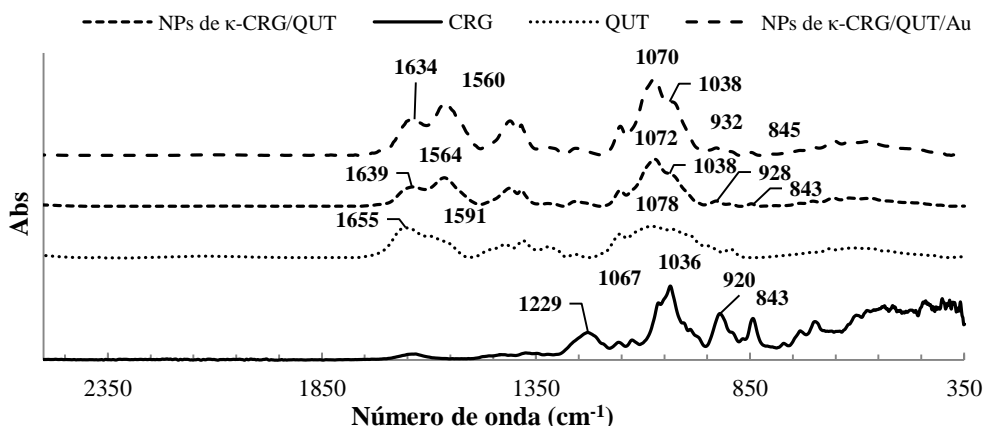
Este deslocamento acontece frequentemente quando ocorre a introdução de NPs metálicas numa matriz polimérica devido à alteração do índice de refração do meio. Por outro lado, o deslocamento da banda pode também dever-se a uma aproximação das nanopartículas entre si, resultando um efeito de acoplamento plasmónico. [80]

Desta forma pode afirmar-se que o nanogéis compósitos de  $\kappa$ -carragenano/quitosano com nanoprismas de ouro adquiriram praticamente as mesmas propriedades óticas que as nanopartículas neles incluídas.

#### 4.2.1.3. Composição Química

##### *Espectroscopia de IV*

O espectro de IV do hidrogel de  $\kappa$ -CRG/QUT encontra-se na figura 36 em simultâneo com os espectros dos biopolímeros puros. Com esta técnica pretende-se verificar a existência dos biopolímeros usados na formulação de NPs mas também a estabilidade das propriedades dos mesmos.



**Figura 36-** Espectros de IV (em modo de absorvância) dos nanogéis de  $\kappa$ -CRG/QUT, de  $\kappa$ -CRG/QUT/Au, de  $\kappa$ -CRG e de QUT.

Através da figura 36 verifica-se que o quitosano apresenta bandas por volta dos  $1655\text{ cm}^{-1}$  e dos  $1591\text{ cm}^{-1}$  correspondentes à amida I e amida II, respetivamente, mas também uma banda centrada a  $1078\text{ cm}^{-1}$  que diz respeito às ligações glicosídeas. [33] Em relação ao espectro do  $\kappa$ -carragenano, este apresenta uma banda a  $1229\text{ cm}^{-1}$ , correspondente à vibração de elongação assimétrica da ligação S-O que é característica dos grupos sulfato, a  $1036$  e  $1067\text{ cm}^{-1}$ , correspondentes às vibrações das ligações C-O e C-OH, respetivamente, mas também apresenta bandas nos  $920$  e  $843\text{ cm}^{-1}$  correspondentes à 3,6 – anidrogactose e à vibração da elongação da ligação C-O-S da  $\alpha(1-3)$ -D-gactose. [33], [69], [76]

O espectro das nanopartículas obtidas através da interação destes dois biopolímeros apresenta uma nova banda de absorção aproximadamente nos  $1564/1560\text{ cm}^{-1}$ , correspondente aos grupos  $\text{NH}_3^+$ , a qual não se verifica nos espectros dos biopolímeros isolados. As bandas que correspondem à amida I e às ligações glicosídicas do quitosano aparecem no espectro das NPs de  $\kappa$ -CRG/QUT sem e com AuNPs a  $1639/1634$  e  $1072/1070\text{ cm}^{-1}$ , respetivamente. Em relação às bandas características do  $\kappa$ -carragenano, estas aparecem mais

uma vez nos 1038 e 1072/1070  $\text{cm}^{-1}$ , correspondendo às vibrações das ligações C-O e C-OH, respetivamente, mas também a 928/932 e 843/845  $\text{cm}^{-1}$  cujas bandas correspondem à 3,6-anidrogactose e à vibração da elongação da ligação C-O-S da  $\alpha(1-3)$ -D-galactose. [33], [69], [76]

Após esta análise é possível afirmar que se formaram nanopartículas de  $\kappa$ -carragenano/quitosano sem e com AuNPs por complexação polielectrolítica dos dois biopolímeros.

#### 4.2.1.4. Propriedades Térmicas

##### DSC

Com o intuito de verificar as propriedades térmicas dos hidrogéis de  $\kappa$ -carragenano/quitosano nanocompósitos e a influência das AuNPs nas mesmas, analisaram-se as respetivas amostras por DSC. Os resultados estão apresentados na figura 37.

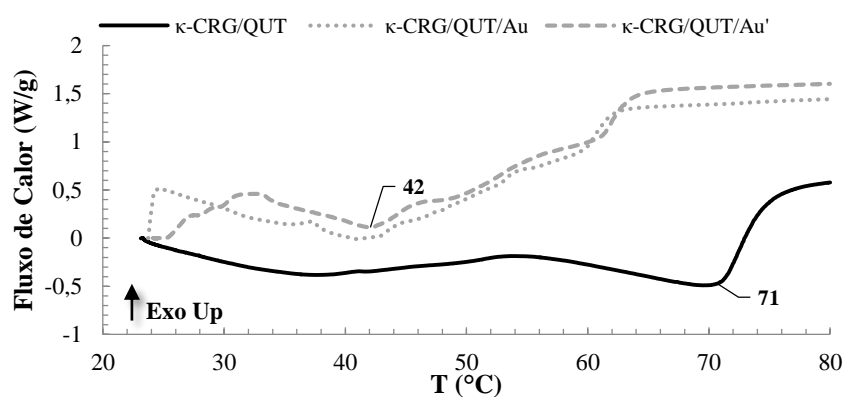


Figura 37 - Termogramas de DSC dos nanogéis de  $\kappa$ -CRG/QUT com e sem AuNPs.

As amostras comportam-se de forma idêntica dado que quando aquecidas apresentam picos endotérmicos que eventualmente correspondem à transição dos hidrogéis para o estado sol. No entanto os nanogéis diferem entre si na localização dos picos. [74]

Enquanto a amostra de  $\kappa$ -CRG/QUT apresenta um pico por volta dos 71°C, a amostra que contém AuNPs apresenta-o por volta dos 42°C. A transição gel-sol ocorre a uma temperatura mais baixa no caso da amostra com AuNPs. Os resultados sugerem que as nanopartículas de ouro podem contribuir para um aquecimento mais rápido e eficaz dos polímeros ou então para a formação de uma rede polimérica mais “fraca” e que portanto se transforma na forma sol a temperaturas mais baixas. A adição destas nanopartículas metálicas torna este hidrogel adequado à aplicação em estudo, a libertação controlada de fármacos, visto que conduz estes materiais a exibirem uma temperatura de transição gel-sol num intervalo de temperaturas compatível com esta aplicação, 37-45°C.



## 4.2.2. Nanogéis de Alginato/Quitosano contendo Nanoprismas de Ouro

### 4.2.2.1. Morfologia e Carga Superficial

#### *Microscopia Eletrônica*

Nas figuras 38 e 39 encontram-se as imagens de microscopia eletrônica dos nanogéis de ALG/QUT sem e com nanopartículas de ouro.

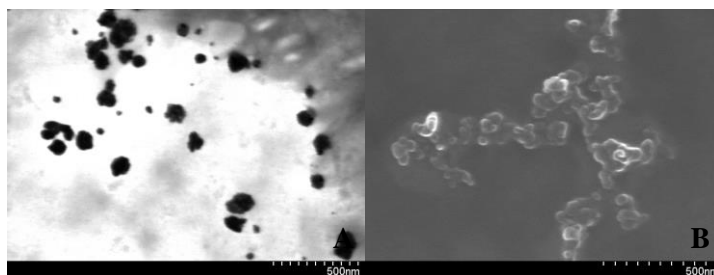


Figura 38 – Imagens de STEM (A) e SEM (B) do nanogel de ALG/QUT sem AuNPs.

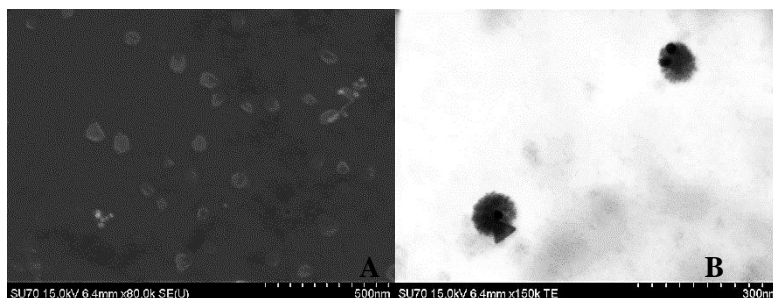


Figura 39 - Imagens de STEM (A) e SEM (B) do nanogel de ALG/QUT com AuNPs.

Observando a figura 38 verifica-se que se formaram NPs de hidrogel resultando nos nanogéis de ALG/QUT. Por outro lado, na figura 39 observam-se os nanogéis compósitos de ouro onde nanoprismas e nanoesferas de ouro se encontram encapsuladas nas nanoesferas de ALG/QUT como era esperado.

#### *Diâmetro Hidrodinâmico e Potencial Zeta*

Analisando as soluções de partida (0,063% (m/m) de ALG e 0,7 mg/mL de QUT) verifica-se que se obtêm diâmetros hidrodinâmicos de 2 e 7 nm, respetivamente. Estas contribuições podem dever-se às longas cadeias de polímero bem como a pequenos agregados das mesmas. Finalizadas as sínteses dos nanogéis, sem e com AuNPs, obtêm-se diâmetros de 1253 nm e 897 nm, respetivamente. No anexo 3, na figura 54.2, encontra-se a evolução do diâmetro hidrodinâmico ao longo da síntese dos nanogéis e na tabela 12 encontram-se os resultados de potencial zeta e diâmetro hidrodinâmico das soluções precursoras dos nanogéis.

Na tabela 8 encontram-se os principais resultados obtidos na caracterização das NPs de ALG/QUT sem e com AuNPs por DLS e potencial zeta. Os valores dos potenciais zeta dos nanogéis obtidos, sem e com nanoprismas de ouro, encontram-se entre -35 e -46 mV, a carga superficial negativa indica a presença de alginato à superfície dos nanogéis.

Tabela 8 – Potencial zeta e diâmetro hidrodinâmico dos nanogéis de ALG/QUT sem e com AuNPs.

Amostra de nanogéis	pH	$\zeta$ (mV)	d (nm)	Z-Average (nm)	PDI
ALG/QUT*	4,9	-41,7 $\pm$ 1,6	1253 $\pm$ 231	1357 $\pm$ 68	0,56 $\pm$ 0,44
ALG/QUT**	4,9	-45,9 $\pm$ 0,35	772 $\pm$ 114	2331 $\pm$ 386	0,58 $\pm$ 0,37
ALG/QUT/Au*	4,5	-35,2 $\pm$ 0,44	897 $\pm$ 124	2560 $\pm$ 267	0,47 $\pm$ 0,18
ALG/QUT/Au**	4,9	-41,6 $\pm$ 1,1	16,9 $\pm$ 2,39	3099 $\pm$ 560	1,0 $\pm$ 0,0

\* após a síntese, sem centrifugar; \*\* após centrifugação e redispersão em água UP

De acordo com a literatura, para sistemas semelhantes, os valores de potencial zeta obtidos são também negativos. [81] O diâmetro hidrodinâmico em número das NPs de ALG/QUT antes e após centrifugação é de 1253 $\pm$ 231 nm e 772 $\pm$ 114 nm a pH=4,9, respetivamente. O valor obtido após centrifugação aproxima-se do valor indicado na literatura, 797 $\pm$ 48 nm a pH=4,7. [35] A disparidade pode em parte ser explicada pela diferença dos valores de pH, que, apesar de pequena poderá afetar significativamente o diâmetro hidrodinâmico das NPs produzidas devido aos mecanismos de pré-gelificação ionotrópica com iões Ca<sup>2+</sup> e de complexação polielectrolítica com o quitosano. [35] O crescimento destes nanogéis, segundo estudos anteriores, está ligado a duas faixas de pH, uma entre os 4,7 e os 5,2 e a outra entre os 4,2 e os 4,7. Se o pH final for superior aos 4,7 o tamanho da NP de hidrogel aumenta ligeiramente mas se o pH descer até valores próximos de 4,0 o tamanho da NP irá sofrer um aumento bastante significativo. [35]

As NPs de ALG/QUT/Au sem centrifugação exibem um diâmetro em número não muito diferente do que é descrito na literatura, 897 $\pm$ 124 nm. No entanto, devido ao elevado valor de PDI obtido, os nanogéis compósitos de ouro após centrifugação não apresentam um resultado fiável, o que poderá dever-se à degradação do material provocado por esta etapa de lavagem.

#### 4.2.2.2. Propriedades Óticas

De forma a investigar as propriedades óticas dos nanocompósitos contendo AuNPs foram efetuados os respetivos espectros Vis-NIR dos mesmos. Na figura 40 pode observar-se o espectro de Vis-NIR do nanocompósito de ouro.

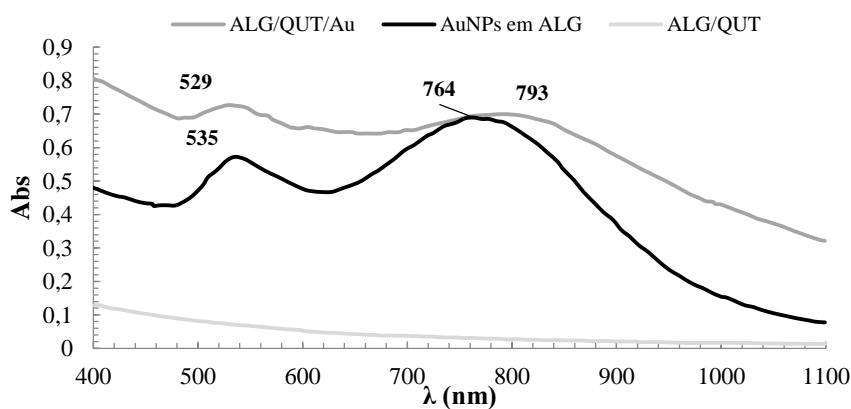


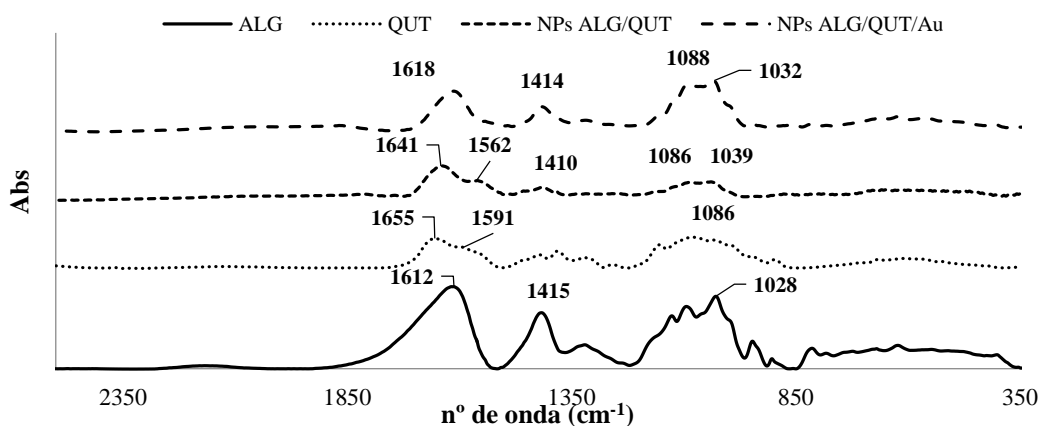
Figura 40 - Espectros Vis-NIR dos nanogéis de ALG/QUT, ALG/QUT/Au e do coloide de nanoprismas de Au usados nestas sínteses.

Como se pode observar na figura 40, as bandas de plasmão nos 793 nm e nos 529 nm indicam a presença de nanoprismas e nanoesferas de ouro no composto sintetizado, respectivamente. Analisando todos os espectros verifica-se que a banda de plasmão transversal se manteve em torno dos 530 nm enquanto a longitudinal, se deslocou cerca de 30 nm, passando dos 764 nm no coloide de nanoprismas para os 793 nm no nanogel compósito. À semelhança do que ocorre com os nanogéis de  $\kappa$ -CRG/QUT compósitos, o deslocamento verificado ocorre muitas vezes quando se introduzem NPs metálicas na matriz polimérica. A alteração do índice de refração do meio e a possibilidade de acoplamento plasmônico são as possíveis causas deste desvio. [80] Assim pode comprovar-se que o nanogéis compósitos de alginato/quitosano com nanoprismas de ouro adquiriram as propriedades óticas das nanopartículas neles incluídos.

#### 4.2.2.3. Composição Química

##### *Espectroscopia de IV*

O espectro de IV do hidrogel de ALG/QUT encontra-se na figura 41 em simultâneo com os espectros dos biopolímeros puros.



**Figura 41 - Espectros de IV dos nanogéis de ALG/QUT, de ALG/QUT/Au, de ALG e de QUT.**

Ao analisar o conjunto de espectros presente na figura 41 pode comprovar-se que o nanogel de ALG/QUT contém estes dois biopolímeros. O respetivo espectro apresenta as principais bandas características do alginato por volta dos 1039 e 1410  $\text{cm}^{-1}$ , que correspondem às vibrações da elongação assimétrica da ligação C-O-C e da elongação simétrica do  $\text{COO}^-$ , respetivamente, mas também as bandas do quitosano em torno dos 1562 e 1086  $\text{cm}^{-1}$  que dizem respeito à amida II e à ligação glicosídica. De notar que o nanogel de ALG/QUT apresenta também uma banda na zona dos 1641  $\text{cm}^{-1}$  que pode corresponder à vibração da elongação assimétrica do  $\text{COO}^-$  do alginato ou à amida I do quitosano. [33], [78], [82]

A análise do nanogel compósito de nanoprismas de ouro permite verificar a presença do alginato, devido às bandas a 1032 e 1414  $\text{cm}^{-1}$ , e do quitosano, devido à banda a 1088  $\text{cm}^{-1}$ . Para além destas bandas, apresenta ainda uma banda a 1618  $\text{cm}^{-1}$  que pode corresponder à vibração da elongação assimétrica do  $\text{COO}^-$  do alginato ou ao deslocamento da amida II do quitosano. Ao conjugar dois biopolímeros de cargas opostas e ao introduzir as AuNPs na matriz polimérica, os espectros IV dos nanogéis que se obtêm apresentam praticamente as mesmas bandas dos seus biopolímeros precursores, mas com ligeiros desvios. [33], [78], [82]

Após esta análise, é possível verificar a interação entre o polímero aniônico e catiónico, dando origem à formação de nanopartículas de ALG/QUT sem e com AuNPs através do processo denominado complexação polielectrolítica.

#### 4.2.2.4. Propriedades Térmicas

##### DSC

Com o objetivo de verificar as propriedades térmicas dos hidrogéis de alginato/quitosano nanocompósitos, bem como a influência das AuNPs nas mesmas, foram analisadas as respectivas amostras por DSC. Os resultados apresentam-se na figura 42.

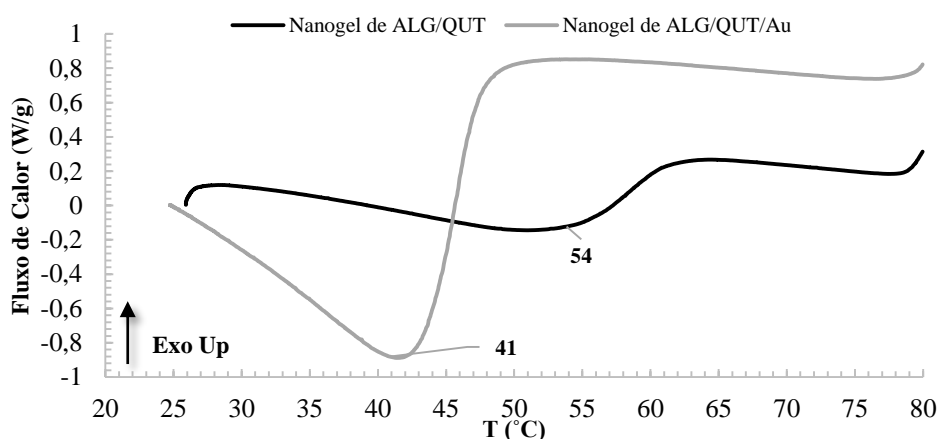


Figura 42 - Termogramas de DSC dos nanogéis de ALG/QUT com e sem AuNPs.

De forma semelhante aos nanogéis de  $\kappa$ -CRG/QUT, os nanogéis de ALG/QUT apresentam picos endotérmicos correspondentes à transição dos mesmos para o estado sol. Apesar dos nanogéis serem compostos pelos mesmos biopolímeros, os picos localizam-se a diferentes valores de temperatura. O hidrogel de ALG/QUT apresenta um pico em torno dos 54°C enquanto o mesmo nanogel compósito de ouro apresenta-o por volta dos 41°C. A introdução de AuNPs na matriz polimérica do nanogel leva a um decréscimo da temperatura a que ocorre a transição gel-sol, efeito que já tinha sido observado nos nanogéis de  $\kappa$ -CRG/QUT/Au. Este decréscimo pode mostrar que as AuNPs proporcionam um aquecimento mais rápido e eficiente ou, por outro lado, que enfraquecem a matriz polimérica e consequentemente muda para o estado sol a uma temperatura mais baixa. Mais uma vez, a inclusão de nanoprismas de ouro permite obter um material que se transforma na forma sol no intervalo de temperatura dos 37-45°C tornando-o mais adequado à libertação controlada de fármacos.

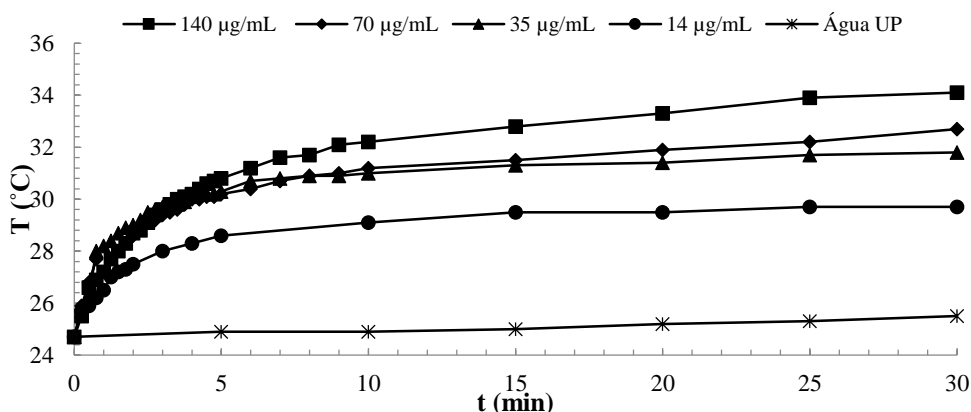
#### 4.3. Avaliação do Efeito Fototérmico

De forma a verificar o efeito da radiação em dispersões dos nanoprismas de ouro realizaram-se ensaios de exposição. Estes ensaios decorreram expondo as dispersões contendo diferentes concentrações de AuNPs

durante 30 minutos a radiação NIR com um comprimento de onda de 785 nm e monitorizando a temperatura da solução.

#### 4.3.1. Nanoprismas de Ouro estabilizados em $\kappa$ -carragenano

A banda longitudinal dos nanoprismas pode ser excitada por radiação na zona NIR provocando um aquecimento rápido e eficiente. Na figura 43 podem observar-se os resultados obtidos para os coloides estabilizados em  $\kappa$ -carragenano de diferentes concentrações e para água UP, quando expostos a 30 minutos de radiação. Nas tabelas 13-15 no anexo 4 podem observar-se todos os resultados da monitorização da temperatura de todas as amostras.



**Figura 43 - Monitorização da temperatura de coloides de AuNPs estabilizadas em  $\kappa$ -carragenano de diferentes concentrações ao longo do tempo de exposição a radiação NIR.**

Na figura 43, pode verificar-se que quanto maior é a concentração do coloide de ouro mais rapidamente se atingem temperaturas finais mais elevadas. Em apenas 5 minutos de exposição, a amostra de 140  $\mu\text{g AuNPs/mL}$  apresenta um aumento de 6,1°C enquanto as amostras de 70 e 35  $\mu\text{g AuNPs/mL}$  apresentam aumentos de 5,5 e 5,6°C, respetivamente. Por último, a amostra menos concentrada, de 14  $\mu\text{g AuNPs/mL}$  apresenta um aumento de 3,9°C. Em relação à água ultrapura, esta apresenta apenas um aumento de 0,2°C no mesmo intervalo temporal, o que confirma que o aquecimento se deve à presença de AuNPs.

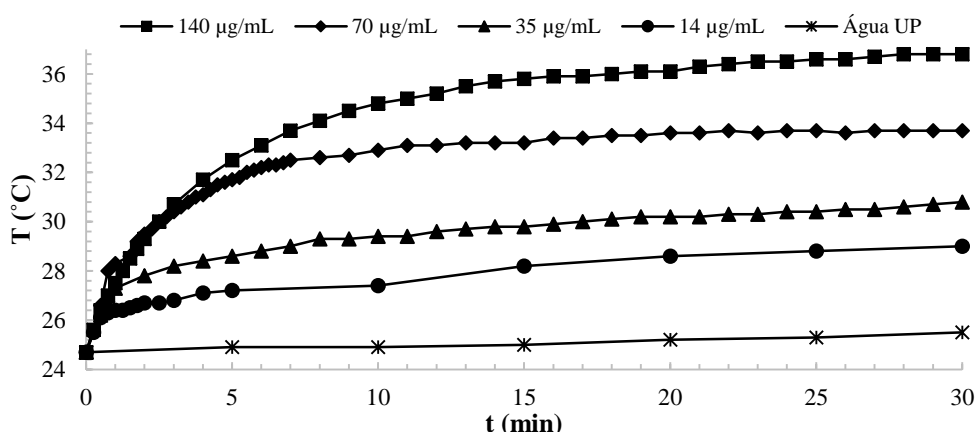
Após 30 minutos de exposição, as amostras 140, 70, 35 e 14  $\mu\text{g/mL}$  mostram aumentos de 9,4, 8, 7,1 e 5 °C, após 30 minutos de exposição. Ao irradiar a dispersão de nanoprismas de ouro mais concentrada durante 5 e 30 minutos permite uma subida de temperatura de 6,1 e 9,4°C, respetivamente. Os aumentos de temperatura verificados sugerem que os nanoprismas de ouro podem ser bastante úteis em terapias térmicas pois possivelmente se se partir da temperatura fisiológica (37 °C), poder-se-iam atingir gamas de temperatura de 42-45°C, gama usada, por exemplo, na hipertermia. Por outro lado, ao potenciar um aumento mais rápido da temperatura do meio torna-os uma ferramenta importante na libertação controlada de fármacos.

Desta forma é possível afirmar que os nanoprismas sintetizados podem ser utilizados para induzir o aquecimento localizado quando expostos a radiação com comprimento de onda nos 785 nm nestas condições experimentais.

### 4.3.2. Nanoprismas de Ouro estabilizados em Alginato

Na figura 44 apresentam-se os resultados obtidos para os coloides estabilizados em alginato de diferentes concentrações e para água ultrapura quando expostos a 30 minutos de radiação. No anexo 4 podem observar-se todos os resultados da monitorização da temperatura de todas as amostras nas tabelas 13, 16-17.

Da mesma forma que os nanoprismas estabilizados em  $\kappa$ -carragenano, os nanoprismas em alginato apresentam temperaturas finais mais elevadas quanto maior é a concentração do coloide de ouro.



**Figura 44 - Monitorização da temperatura de coloides de AuNPs estabilizadas em alginato de diferentes concentrações ao longo do tempo de exposição a radiação NIR.**

Após 5 minutos de exposição, a amostra de 140 µg AuNPs/mL apresenta um aumento de 7,8°C enquanto as amostras de 70 e 35 µg AuNPs/mL apresentam aumentos de 7 e 3,9°C, respetivamente. A amostra menos concentrada, de 14 µg AuNPs/mL apresenta um aumento de 2,5°C. No que diz respeito à água ultrapura, esta mostra apenas um aumento de 0,2°C no mesmo intervalo de tempo. Após 30 minutos de exposição, as amostras 140, 70, 35 e 14 µg AuNPs/mL apresentam aumentos de temperatura de 12,1, 9, 6,1 e 4,3 °C.

Assim como os nanoprismas de ouro em  $\kappa$ -carragenano, estes nanoprismas apresentam aumentos bastante significativos de temperatura, com potencial tanto para terapias térmicas como para libertação controlada de fármacos. Então estas nanopartículas são também viáveis para a indução de aquecimento localizado quando expostos a radiação com comprimento de onda nos 785 nm.

## 4.4. Ensaio de Encapsulação

Para esta etapa do trabalho selecionaram-se apenas os nanogéis de  $\kappa$ -CRG/QUT pois apresentaram menos dificuldades na sua preparação.

Os cálculos da eficiência e capacidade de encapsulação do AM foram realizados através das equações 8 e 9, respetivamente. [74]

$$EE (\%) = \frac{m_{DI} - m_{DSP}}{m_{DI}} \times 100 \quad \text{Equação 8}$$

$$CE (\%) = \frac{m_{DN}}{m_N} \times 100 \quad \text{Equação 9}$$

$$m_{DN} = m_{DI} - m_{DSP} \quad \text{Equação 10}$$

Nas equações 8, 9 e 10,  $m_{DI}$  é a massa inicial do AM em solução,  $m_{DSP}$  é a massa de AM presente no sobrenadante após encapsulação,  $m_{DN}$  é a massa do AM encapsulado nos nanogéis e  $m_N$  é a massa inicial de nanogéis liofilizados. A massa de AM encapsulada nos nanogéis foi calculada através dos resultados obtidos por espectroscopia UV-Vis dos sobrenadantes resultantes da encapsulação através das retas de calibração deste fármaco presentes no anexo (Figuras 55 e 56). Na tabela 9 encontram-se os principais resultados obtidos nos ensaios de encapsulação de AM para os nanogéis em estudo. Os nanogéis compósitos com 2,93 e 3,73% (m/m) de AuNPs correspondem aos nanogéis compósitos 1 (de  $\kappa$ -CRG/QUT/Au 1) e 2 (de  $\kappa$ -CRG/QUT/Au 2), respetivamente. Na tabela 18, no anexo 6, encontram-se os resultados obtidos nos ensaios de encapsulação.

**Tabela 9 – Resultados dos ensaios de encapsulação de AM prévios aos ensaios de libertação.**

	EE (%)	CE (%)
<b>Nanogel</b>	41,47±6,35	3,70±0,69
<b>Nanogel Compósito @ 2,3%(m/m) AuNPs</b>	33,69±4,98	2,91±0,43
<b>Nanogel Compósito @ 2,93%(m/m) AuNPs</b>	45,53±1,52	3,93±0,13
<b>Nanogel Compósito @ 3,73%(m/m) AuNPs</b>	43,99±1,58	3,80±0,14

Analisando a tabela 9 verifica-se que a eficiência de encapsulação do AM se encontra entre os 34-46 % enquanto a capacidade de encapsulação ronda os 3-4 %. Sabe-se que a encapsulação do AM ocorre devido à diferença entre as cargas deste e do  $\kappa$ -carragenano. Como um dos biopolímeros usados na síntese dos nanogéis é aniónico e as moléculas de AM são catiónicas, estas interagem com os seus grupos sulfato disponíveis resultando no encapsulamento do fármaco modelo nos nanogéis. [74]

Não se observam diferenças significativas nos parâmetros de encapsulação de AM nos nanogéis sem e com nanopartículas de ouro. A eficiência de encapsulação (34-46%) é da mesma ordem de grandeza que a observada na encapsulação de AM em nanogéis de  $\kappa$ -carragenano. No entanto, o teor de AM encapsulado (3-4%) é cerca de dez vezes superior, o que sugere que a presença de quitosano também contribui para a encapsulação do fármaco modelo. [74]

## 4.5. Ensaios de Libertação Controlada de AM

Os ensaios de libertação do AM a partir dos nanogéis de  $\kappa$ -carragenano/quitosano compósitos sintetizados realizaram-se sem e com radiação NIR.

### 4.5.1. Sem Exposição a Radiação NIR

Numa primeira fase realizaram-se ensaios de libertação do AM sem exposição a radiação NIR a uma temperatura constante de 37°C de modo a compreender o seu impacto na libertação. As curvas cumulativas de libertação de AM foram calculadas através da equação 11. [75]

$$\% \text{Libertação} = \frac{V_{ML} \times C_R + \sum_{i=0}^{n-1} C_i}{m_0} \times 100 \quad \text{Equação 11}$$

Na equação 11,  $V_{ML}$  é o volume do meio de libertação,  $C_n$  é a concentração mássica de AM (por mL) da alíquota no momento  $t$ ,  $C_i$  é a concentração mássica de AM (por mL) da alíquota,  $n$  é o número total de alíquotas extraídas até ao momento  $t$  e  $m_0$  é a massa de AM encapsulada nos nanogéis.

Na figura 45 podem-se visualizar as curvas cumulativas de libertação dos nanogéis de  $\kappa$ -carragenano/quitosano sem e com AuNPs. Em pormenor apresentam-se as 5 horas iniciais da libertação do AM nestes nanogéis. No anexo 7, nas tabelas 19 e 20, podem encontrar-se os resultados obtidos nos ensaios de libertação de AM.

No momento  $t = 0$  min verificaram-se libertações de 5,7 e 7,0 % nos nanogéis sem e com AuNPs, respetivamente. Esta rápida e imediata libertação de AM no início do ensaio deve-se provavelmente ao AM adsorvido à superfície dos nanogéis, cujo fenómeno se dá o nome de *burst effect*.

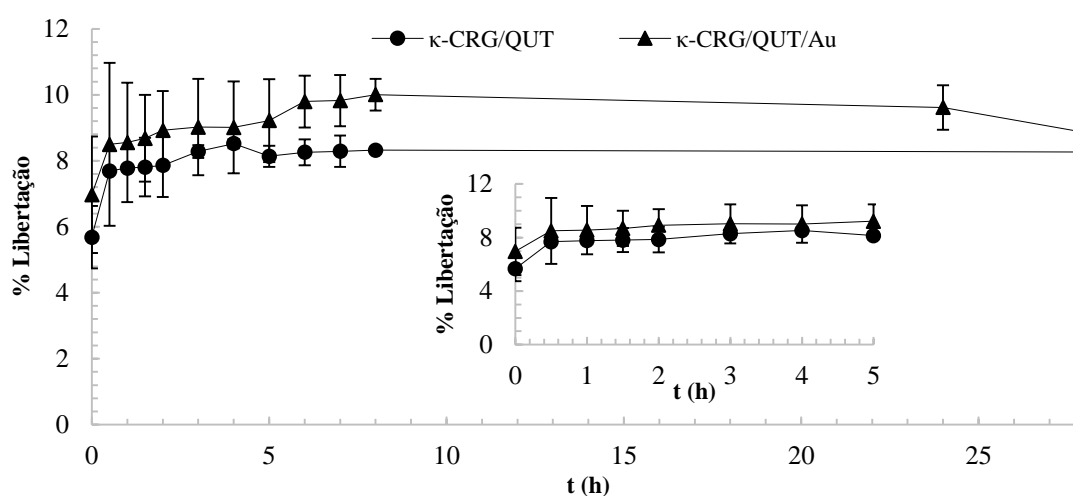


Figura 45 – Curva cumulativa de libertação do AM a partir de nanogéis de  $\kappa$ -carragenano/quitosano sem e com AuNPs sem exposição a radiação NIR.

Posteriormente a este fenómeno, os nanogéis de  $\kappa$ -CRG/QUT apresentam uma libertação lenta, atingindo um patamar de aproximadamente 8% de libertação após 5 horas. Este efeito pode dever-se ao facto de ao longo das extrações de alíquotas, a concentração ir diminuindo traduzindo-se numa maior dificuldade em detetar a quantidade de AM por espectroscopia. [75]

De forma semelhante, no caso dos nanogéis compósitos de ouro, a libertação segue a mesma tendência, isto é, após a libertação inicial imediata esta estabiliza com o tempo em torno dos 9%. O comportamento de libertação é idêntico nos dois casos, não havendo diferenças significativas na % de libertação.

#### 4.5.2. Com Exposição a Radiação NIR

Na figura 46 encontram-se representadas as curvas cumulativas de libertação de AM dos nanogéis sem e com AuNPs quando expostos a radiação NIR. De notar que o tempo dos ensaios com radiação é bastante inferior aos anteriores devido à impossibilidade de manter o laser ligado por períodos de tempo prolongados. Nas tabelas 21 e 22, no anexo 7, podem observar-se os resultados obtidos nos ensaios de libertação de AM a partir dos nanogéis após incidência de radiação NIR e à temperatura ambiente, respetivamente.



De maneira a observar o efeito da concentração de AuNPs na liberação de AM realizaram-se ensaios a partir de amostras com diferentes teores de ouro. Apesar de não se notar o *burst effect* devido ao intervalo temporal diminuto, a % liberação de AM no momento  $t_{\text{exp}} = 0$  min é de 2,4, 7,4 e 10,5 % no  $\kappa$ -CRG/QUT,  $\kappa$ -CRG/QUT/Au 1 e  $\kappa$ -CRG/QUT/Au 2, respetivamente. Quando expostos à radiação de 785 nm, os nanogéis compósitos de ouro apresentam uma maior % de liberação relativamente aos nanogéis sem ouro. Decorridos 60 minutos, os nanogéis sem ouro apresentam uma % liberação de 20% enquanto os nanogéis com ouro,  $\kappa$ -CRG/QUT/Au 1 e  $\kappa$ -CRG/QUT/Au 2, apresentam % de liberação de 32,4 e 45,5 %, respetivamente.

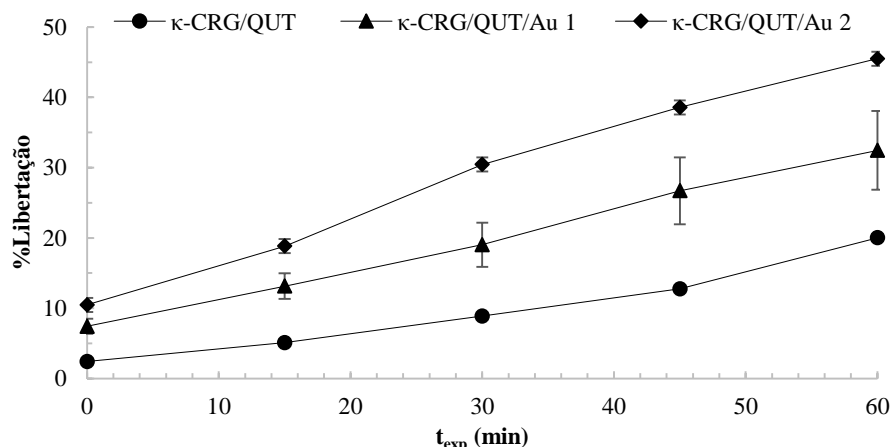


Figura 46 - Curva cumulativa de liberação do AM a partir de nanogéis de  $\kappa$ -carragenano/quitosano sem e com AuNPs com exposição a radiação NIR.

Para estudar o efeito da exposição a radiação NIR na liberação de AM na formulação com maior teor de ouro efetuou-se um ensaio de liberação à temperatura ambiente sem exposição a radiação NIR. Através da figura 47 verifica-se que a exposição dos nanogéis a radiação NIR proporciona uma maior taxa de liberação de AM. A radiação por si só leva a uma maior liberação de AM devido ao aquecimento localizado resultante do efeito fototérmico. Após 60 minutos, os nanogéis sem exposição a radiação libertam 29% enquanto os mesmos expostos à radiação libertam 45,5%.

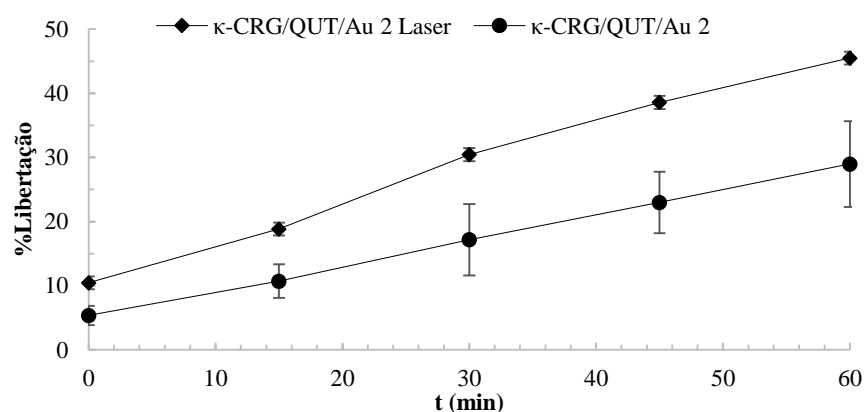


Figura 47 – Comparação das curvas de cinética de liberação do AM a partir dos nanogéis  $\kappa$ -CRG/QUT/Au 2 sem e com o efeito do laser.

A introdução de nanoprismas de ouro nos nanogéis conduz a um aumento de temperatura superior e mais rápido, promovendo o intumescimento do hidrogel e consequentemente a uma liberação mais eficaz, devido à natureza termossensível dos biopolímeros usados.

Os resultados obtidos indicam que os nanogéis sintetizados são adequados à aplicação em estudo, isto é, à liberação controlada de fármacos utilizando radiação NIR como estímulo. Apesar de se observar sempre uma pequena liberação inicial, inerente à desorção do AM da superfície do material, os resultados mostram que a liberação de AM pode ser controlada através deste sistema nanocompósito.

#### 4.6. Modelação da Cinética de Libertação

Com o objetivo de investigar os melhores modelos/equações teóricos que descreveriam a liberação do AM a partir dos nanogéis preparados realizou-se a modelação cinética dos resultados obtidos nos ensaios de liberação de acordo com os modelos/equações descritos na revisão bibliográfica (secção 2.5). No anexo 8 encontram-se as tabelas (Tabelas 23-26) e representações gráficas (Figuras 57-62) destes dados relativamente a cada modelo/equação estudado. Na tabela 10 encontram-se os parâmetros cinéticos estimados e respetivos coeficientes de determinação. Nas cinéticas de ordem 0 e 1, a constante  $k$  encontra-se em  $\text{min}^{-1}$  enquanto nos modelos cinéticos de Korsmeyer-Peppas e Higuchi se encontra em  $\text{min}^{-n}$  e  $\text{min}^{-0,5}$ , respetivamente.

De um modo geral, a liberação de AM a partir dos nanogéis estudados pode ser descrita pelo modelo cinético de Korsmeyer-Peppas, efetivamente este modelo é abundantemente usado para descrever liberação de fármacos a partir de matrizes poliméricas. Na tabela 10 podem observar-se os parâmetros cinéticos obtidos na modelação cinética para os diferentes ensaios de liberação do fármaco modelo. Nos ensaios sem exposição a radiação, com a temperatura a  $37^\circ\text{C}$ , verificou-se que é o modelo de Korsmeyer-Peppas que melhor descreve a liberação a partir de nanogéis e, quando se introduzem AuNPs nos mesmos, esta adequa-se melhor a uma cinética de ordem 1. Ao analisar o valor do coeficiente de liberação ( $n$ ) obtido no caso dos nanogéis pode afirmar-se que a liberação é controlada por difusão Fickiana visto que se encontra abaixo de 0,43. [6], [71]

**Tabela 10 – Parâmetros cinéticos e coeficiente de determinação obtidos na modelação cinética dos dados de liberação dos nanogéis de  $\kappa$ -CRG/QUT sem e com efeito de radiação.**

Nanogel			Ordem 0	Ordem 1	Korsmeyer-Peppas	Higuchi
Sem radiação @ $37^\circ\text{C}$	$\kappa$ -CRG/QUT	$r^2$	0,7944	0,7940	0,9767	0,8514
		$k$	1,38E-05	17,2E-05	0,0739	40,2E-05
		$n$	-	-	0,0166	-
	$\kappa$ -CRG/QUT/Au	$r^2$	0,9537	0,9676	0,8843	0,9487
		$k$	3,39E-05	36,8E-05	0,0670	94,7E-05
		$n$	-	-	0,0612	-
Com radiação	$\kappa$ -CRG/QUT	$r^2$	0,9642	0,9798	0,9792	0,9334
		$k$	0,0029	0,0344	0,0037	0,0369
		$n$	-	-	0,9530	-
	$\kappa$ -CRG/QUT/Au 1	$r^2$	0,9973	0,9673	0,9900	0,9863
		$k$	0,0042	0,0244	0,0216	0,0505
		$n$	-	-	0,6575	-
	$\kappa$ -CRG/QUT/Au 2	$r^2$	0,9926	0,9396	0,9977	0,9995
		$k$	0,0060	0,0244	0,0340	0,0687
		$n$	-	-	0,6374	-
Sem radiação @ $T_{\text{amb}}$	$\kappa$ -CRG/QUT/Au 2	$r^2$	0,9994	0,9506	0,9989	0,9935
		$k$	0,0040	0,0276	0,0154	0,0467
		$n$	-	-	0,7128	-

Em relação aos ensaios efetuados com radiação NIR, observa-se que a liberação nos nanogéis é regida por cinética de ordem 1 ou pelo modelo de Korsmeyer-Peppas. Como o coeficiente  $n > 0,85$  o mecanismo de liberação corresponde ao caso II de transporte, por intumescimento do polímero. [6], [71] Ao introduzir os nanoprismas de ouro, a liberação de AM é descrita por uma cinética de ordem 0 no compósito 1, enquanto no compósito 2, a liberação é modelada por Higuchi, isto é, a liberação ocorre por difusão Fickiana. [70] À temperatura ambiente, a liberação do compósito 2 apresenta uma cinética de ordem 0 ou modelada por Korsmeyer-Peppas, cujo coeficiente de liberação se encontra entre 0,43 e 0,85 indicando mecanismo de transporte anômalo, isto é, a liberação é afetada por fenômenos de difusão Fickiana e por intumescimento do polímero. [71] O fato de alguns casos de liberação apresentarem cinéticas de ordem 0 também está de acordo com os materiais em estudo, pois a cinética de ordem 0 caracteriza sistemas onde o fármaco é libertado lentamente sem ocorrer desagregação da matriz apenas devido ao intumescimento do hidrogel. [70], [71]



## 5. Conclusões e Perspetivas de Trabalho Futuro

Os nanoprismas de ouro preparados neste trabalho apresentam uma banda de plasmão intensa na zona NIR (~800 nm) e, devido à presença de biopolímero ( $\kappa$ -carragenano e alginato) mantêm-se estáveis em solução por algumas semanas. Por microscopia eletrónica confirmou-se que as AuNPs apresentam a morfologia triangular plana e que estão também presentes nanoesferas de ouro. Apesar das tentativas em otimizar a preparação destas nanopartículas, não foi possível obter um coloide contendo unicamente nanoprismas de ouro. O comprimento médio de aresta dos nanoprismas preparados foi de 55-57 nm, enquanto as nanoesferas apresentam um diâmetro médio de 20-22 nm. A presença de biopolímero nos coloides de ouro foi confirmada por espectroscopia de IV e por medidas da carga superficial (potencial zeta) das nanopartículas.

As nanopartículas de hidrogel (nanogéis) foram preparadas por complexação polieletrólítica de biopolímeros de origem natural, de cargas opostas, quitosano com  $\kappa$ -carragenano e quitosano com alginato. A formação dos nanogéis foi comprovada por microscopia eletrónica, espectroscopia de IV e medidas de diâmetro hidrodinâmico por análise de dispersão dinâmica de luz. No mesmo sentido foi possível preparar os respetivos nanogéis compósitos de ouro contendo os nanoprismas. Através de espectroscopia Vis-NIR foi possível confirmar que estes adquiriram as propriedades óticas dos nanoprismas de ouro neles incorporados. No entanto, por microscopia eletrónica verificou-se que a encapsulação nem sempre é a mais adequada, observando-se a agregação das AuNPs, nomeadamente nos sistemas envolvendo quitosano e  $\kappa$ -carragenano. Apesar do método de preparação de nanoprismas de ouro ser inovador e ter grande potencial na farmacologia/medicina por não incluir um tensioativo, como na maioria dos protocolos, neste caso acaba por afetar a sua encapsulação nos nanogéis. A análise por DSC mostra que os nanogéis formados são sensíveis à temperatura, apresentando uma transição para o estado sol. A incorporação de nanoprismas tornam estes hidrogéis mais adequados à aplicação em estudo, a libertação controlada de fármacos, visto que possibilitam que estes materiais exibam uma temperatura de transição sol-gel num intervalo de temperaturas compatível com a sua aplicação, 37-45°C.

Os ensaios de avaliação do efeito fototérmico das AuNPs permitem concluir que quanto maior for a concentração de ouro nas amostras maior e mais rápida é a subida de temperatura dos coloides. Desta forma é possível afirmar que os nanoprismas sintetizados podem ser utilizados para induzir o aquecimento localizado quando expostos a radiação com comprimento de onda nos 785 nm devido ao efeito fototérmico.

Em relação aos ensaios de libertação de AM, verificou-se que no caso dos materiais sem exposição a radiação NIR esta ocorre de modo lento e gradual. A introdução de nanoprismas de ouro nos nanogéis conduz a uma maior libertação de AM, e pode ser controlada por radiação NIR, conferindo a estes materiais propriedades desejáveis em dispositivos de libertação controlada. A modelação dos resultados obtidos nestes ensaios mostram, de um modo geral, que estes são razoavelmente descritos pelas equações de cinética de ordem 0 e pelo modelo de Korsmeyer-Peppas. Nos nanogéis é o modelo de Korsmeyer-Peppas que melhor se ajusta aos dados experimentais, no entanto, quando se aplica radiação a libertação pode também ser descrita por uma cinética de ordem 1. O nanogel compósito sem exposição a radiação apresenta também uma cinética de ordem

## 5. Conclusões e Perspetivas de Trabalho Futuro

1 como o melhor ajuste. No caso dos nanogéis compósitos com 2,93 e 3,73% (m/m) de nanopartículas de ouro, a libertação de AM é descrita por uma cinética de ordem 0 e pelo modelo de Higuchi, respetivamente. À temperatura ambiente, a libertação do compósito com maior teor de ouro apresenta uma cinética de ordem 0 mas também pode ser descrita pelo modelo de Korsmeyer-Peppas. Estes estudos permitem concluir que o mecanismo de libertação de azul-de-metileno é controlado, de uma forma genérica, por difusão.

No futuro seria interessante utilizar biopolímeros com grupos tiol de forma a evitar a agregação dos nanoprismas de ouro visto que estes grupos têm afinidade por superfícies metálicas. As etapas de lavagem deveriam ser otimizadas com o objetivo de minimizar o elevado número de nanoesferas formadas durante as sínteses. Em relação aos ensaios de avaliação do efeito fototérmico e de libertação, a montagem experimental deveria ser isolada e mantida num ambiente a temperatura constante.

## 6. Bibliografia

- [1] Wei, A., Mehtala, J. G., Patri, A. K., “Challenges and Opportunities in the Advancement of Nanomedicines”, *Journal of Controlled Release*, 164:2 (2012), 236–246.
- [2] Chakraborty, M., Jain, S., Rani, V., “Nanotechnology: Emerging Tool for Diagnostics and Therapeutics”, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 165:5–6 (2011), 1178–1187.
- [3] Sahoo, S. K., Parveen, S., Panda, J. J., “The Present and Future of Nanotechnology in Human Health Care”, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 3:1 (2007), 20–31.
- [4] Timko, B. P., Kohane, D. S., “Materials to Clinical Devices: Technologies for Remotely Triggered Drug Delivery”, *Clinical Therapeutics*, 34:11 (2012), S25–35.
- [5] Hamidi, M., Azadi, A., Rafiei, P., “Hydrogel Nanoparticles in Drug Delivery”, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60:15 (2008), 1638–1649.
- [6] Lin, C. C., Metters, A. T., “Hydrogels in Controlled Release Formulations: Network Design and Mathematical Modeling”, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58:12–13 (2006), 1379–1408.
- [7] Daniel-da-Silva, A., Trindade, T., “Biofunctional Composites of Polysaccharides Containing Inorganic Nanoparticles” in *Advances in Nanocomposite Technology*, A. Hashim, Ed. InTech, 2011. ISBN: 978-953-307-347-7.
- [8] Pissuwan, D., Valenzuela, S. M., Cortie, M. B., “Therapeutic Possibilities of Plasmonically Heated Gold Nanoparticles”, *Trends in Biotechnology*, 24:2 (2006), 62–67.
- [9] Pelaz, B., Grazu, V., Ibarra, A., Magen, C., del Pino, P., de la Fuente, J. M., “Tailoring the Synthesis and Heating Ability of Gold Nanoprisms for Bioapplications”, *Langmuir: The ACS Journal of Surfaces and Colloids*, 28:24 (2012), 8965–8970.
- [10] Ferreira, P. C., Gil, M. H., Fonseca, A. C., Alves, P., Coelho, J. F., Cordeiro, R., Góis, J. R., “Drug Delivery Systems: Advanced Technologies Potentially Applicable in Personalized Treatments”, *The EPMA Journal*, 1:1 (2010), 164–209.
- [11] Haley, B., Frenkel, E., “Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer Treatment”, *Urologic Oncology*, 26:1 (2008), 57–64.
- [12] Silva, A. (2011). “Design and Production of New Nanodevices for Future Application in Cancer Therapy”. Tese de Mestrado em Ciências Biomédicas. Universidade da Beira Interior, Covilhã.
- [13] Faraji, A. H., Wipf, P., “Nanoparticles in Cellular Drug Delivery”, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17:8 (2009), 2950–2962.
- [14] Singh, R., Lillard, J. W., “Nanoparticle-based Targeted Drug Delivery”, *Experimental and Molecular Pathology*, 86:3 (2009), 215–223.
- [15] Misra, R., Acharya, S., Sahoo, S. K., “Cancer Nanotechnology: Application of Nanotechnology in Cancer Therapy”, *Drug Discovery Today*, 15:19–20 (2010), 842–850.
- [16] Ferrari, M., “Cancer Nanotechnology: Opportunities and Challenges”, *Nature Reviews. Cancer*, 5:3 (2005), 161–171.
- [17] Parveen, S., Misra, R., Sahoo, S. K., “Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging”, *Nanomedicine : Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 8:2 (2012), 147–166.
- [18] Peppas, N. A., Bures, P., Leobandung, W., Ichikawa, H., “Hydrogels in Pharmaceutical Formulations”, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 50:1 (2000), 27–46.
- [19] Coimbra, P. M. A. (2010), “Preparação e Caracterização de Sistemas de Libertação Controlada de Fármacos com Base em Polímeros de Origem Natural”. Tese de Doutoramento. Universidade de Coimbra, Coimbra.
- [20] Coviello, T., Matricardi, P., Marianecchi, C., Alhaique, F., “Polysaccharide Hydrogels for Modified Release Formulations”, *Journal of Controlled Release*, 119:1 (2007), 5–24.

- [21] Gulrez, S. K. H., Al-assaf, S., Phillips, G. O., "Hydrogels: Methods of Preparation, Characterisation and Applications" in Progress in Molecular and Environmental Bioengineering - From Analysis and Modeling to Technology Applications, A. Carpi, Ed. InTech, 2011. ISBN: 978-953-307-268-5.
- [22] Alvarez-lorenzo, C., Blanco-fernandez, B., Puga, A. M., Concheiro, A., "Crosslinked Ionic Polysaccharides for Stimuli-sensitive Drug Delivery", *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65:9 (2013), 1148–1171.
- [23] Sood, N., Nagpal, S., Nanda, S., Bhardwaj, A., Mehta, A., "Review: An Overview on Stimuli Responsive Hydrogels as Drug Delivery System", *Journal of Controlled Release*, 2013.
- [24] Campo, V. L., Kawano, D. F., da Silva, D. B., Carvalho, I., "Carrageenans: Biological Properties, Chemical Modifications and Structural Analysis – A Review", *Carbohydrate Polymers*, 77:2 (2009), 167–180.
- [25] Mangione, M. R., Giacomazza, D., Bulone, D., Martorana, V., Cavallaro, G., San Biagio, P. L., "K<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup> Effects on the Gelation Properties of  $\kappa$ -Carrageenan", *Biophysical Chemistry*, 113:2 (2005), 129–135.
- [26] Mangione, M. R., Giacomazza, D., Bulone, D., Martorana, V., San Biagio, P. L., "Thermoreversible Gelation of  $\kappa$ -carrageenan: Relation Between Conformational Transition and Aggregation", *Biophysical Chemistry*, 104:1 (2003), 95–105.
- [27] Silva, T. H., Alves, A., Popa, E. G., Reys, L. L., Gomes, M. E., Sousa, R., Silva, S. S., Mano, J. F., Reis, R. L., "Marine Algae Sulfated Polysaccharides for Tissue Engineering and Drug Delivery Approaches", *Biomatter*, 2:4 (2012), 278–289.
- [28] Salgueiro, A. M., Daniel-da-Silva, A. L., Fateixa, S., Trindade, T., " $\kappa$ -Carrageenan Hydrogel Nanocomposites with Release Behavior Mediated by Morphological Distinct Au Nanofillers", *Carbohydrate Polymers*, 91:1 (2013), 100–109.
- [29] Sundar, S., Kundu, J., Kundu, S. C., "Biopolymeric Nanoparticles", *Science and Technology of Advanced Materials*, 11:1 (2010), 1-13.
- [30] Gacesa, P., "Alginates", *Carbohydrate Polymers*, 8:3 (1988), 161-182.
- [31] Muntimadugu, E., Ickowicz, D. E., Domb, A. J., Khan, W., "Polysaccharide Biomaterials", *Israel Journal of Chemistry*, 53:9–10 (2013), 787–794.
- [32] Martínez, A., Fernández, A., Pérez, E., Benito, M., Teijón, J. M., Blanco, M. D., "Polysaccharide-Based Nanoparticles for Controlled Release Formulations" in *The Delivery of Nanoparticles*, A. A. Hashim, Ed. InTech, 2012. ISBN: 978-953-51-0615-9.
- [33] Santo, E., Mano, F., Grenha, A., Gomes, M. E., Neves, N. M., Reis, R. L., "Development of New Chitosan/Carrageenan Nanoparticles for Drug Delivery Applications", *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 92A:4 (2010), 1265–1272.
- [34] Luo, Y., Wang, Q., "Recent Development of Chitosan-based Polyelectrolyte Complexes with Natural Polysaccharides for Drug Delivery", *International Journal of Biological Macromolecules*, 64 (2014), 353–367.
- [35] Sarmento, B., Ferreira, D., Veiga, F., Ribeiro, A., "Characterization of insulin-loaded alginate nanoparticles produced by ionotropic pre-gelation through DSC and FTIR studies", *Carbohydrate Polymers*, 66:1 (2006), 1-7.
- [36] Tomatsu, I., Peng, K., Kros, A., "Photoresponsive Hydrogels for Biomedical Applications", *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63:14–15 (2011), 1257–1266.
- [37] Brulé, S., Levy, M., Wilhelm, C., Letourneur, D., Gazeau, F., Ménager, C., Le Visage, C., "Doxorubicin Release Triggered by Alginate Embedded Magnetic Nanoheaters: a combined therapy", *Advanced Materials*, 23:6 (2011), 787–790.
- [38] Mieszawska, A. J., Mulder, W. J. M., Fayad, Z. A., Cormode, D. P., "Multifunctional Gold Nanoparticles for Diagnosis and Therapy of Disease", *Molecular Pharmaceutics*, 10:3 (2013), 831–847.
- [39] Kabanov, A. V., Vinogradov, S. V., "Nanogels as Pharmaceutical Carriers: Finite Networks of Infinite Capabilities", *Angewandte Chemie*, 48:30 (2009), 5418–5429.
- [40] Satarkar, N. S., Biswal, D., Hilt, J. Z., "Hydrogel Nanocomposites: a review of applications as remote controlled biomaterials", *Soft Matter*, 6:11 (2010), 2364- 2371.



- [41] Oh, J. K., Lee, D. I., Park, J. M., “Biopolymer-based Microgels/Nanogels for Drug Delivery Applications”, *Progress in Polymer Science*, 34:12 (2009), 1261–1282.
- [42] Jain, P., El-Sayed, I., El-Sayed, M., “Au Nanoparticles Target Cancer”, *Nano Today*, 2:1 (2007), 18–29.
- [43] Strong, L. E., West, J. L., “Thermally Responsive Polymer-nanoparticle Composites for Biomedical Applications”, *Wiley interdisciplinary reviews. Nanomedicine and nanobiotechnology*, 3:3 (2011), 307–317.
- [44] Huang, X., El-Sayed, M. A., “Gold Nanoparticles: Optical Properties and Implementations in Cancer Diagnosis and Photothermal Therapy”, *Journal of Advanced Research*, 1:1 (2010), 13–28.
- [45] Qin, Z., Bischof, J. C., “Thermophysical and Biological Responses of Gold Nanoparticle Laser Heating”, *Chemical Society Reviews*, 41:3 (2012), 1191–1217.
- [46] Martins, M., Trindade, T., “Os Nanomateriais e a Descoberta de Novos Mundos na Bancada do Químico”, *Química Nova*, 35:7 (2012), 1434–1446.
- [47] García, B. P. (2012), “Tailoring the Synthesis and the Functionalization of Nanoparticles for Nanomedicine”. Tese de Doutorado. Universidade de Saragoça, Saragoça, Espanha.
- [48] Bayazitoglu, Y., Kheradmand, S., Tullius, T. K., “An Overview of Nanoparticle Assisted Laser Therapy”, *International Journal of Heat and Mass Transfer*, 67 (2013), 469–486.
- [49] Maity, S., Bochinski, J. R., Clarke, L. I., “Metal Nanoparticles Acting as Light-Activated Heating Elements within Composite Materials”, *Advanced Functional Materials*, 22:24 (2012), 5259–5270.
- [50] Maity, S., Downen, L. N., Bochinski, J. R., Clarke, L. I., “Embedded Metal Nanoparticles as Localized Heat Sources: An alternative processing approach for complex polymeric materials”, *Polymer*, 52:7 (2011), 1674–1685.
- [51] Ghosh, P., Han, G., De, M., Kim, C. K., Rotello, V. M., “Gold Nanoparticles in Delivery Applications”, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60:11 (2008), 1307–1315.
- [52] Duncan, B., Kim, C., Rotello, V. M., “Gold Nanoparticle Platforms as Drug and Biomacromolecule Delivery Systems”, *Journal of Controlled Release*, 148:1 (2010), 122–127.
- [53] Alanazi, F. K., Radwan, A. A., Alsarra, I. A., “Biopharmaceutical Applications of Nanogold”, *Saudi Pharmaceutical Journal*, 18:4 (2010), 179–193.
- [54] Shenoi, M., Shah, N., Griffin, R., “Nanoparticle Preconditioning for Enhanced Thermal Therapies in Cancer”, *Nanomedicine*, 6:3 (2011), 545–563.
- [55] Wang, R., Billone, P. S., Mullett, W. M., “Nanomedicine in Action: An Overview of Cancer Nanomedicine on the Market and in Clinical Trials”, *Journal of Nanomaterials*, 2013:5 (2013), 1–12.
- [56] MagForce, “Advancing nanomedicine into patient therapy”. [Consult. 03 Mar. 2014]. Disponível em: <http://www.magforce.de/en/studien.html>
- [57] Celsion, “ThermoDox - Pipeline within a program”. [Consult. 03 Mar. 2014]. Disponível em: [http://celsion.com/docs/pipeline\\_overview](http://celsion.com/docs/pipeline_overview)
- [58] CYTIMMUNE Sciences Inc., “Drug Pipeline”. [Consult. 03 Mar. 2014]. Disponível em: <http://www.cytimmune.com/go.cfm?do=Page.View&pid=19>
- [59] Cherukuri, P., Glazer, E. S., Curley, S. A., “Targeted Hyperthermia using Metal Nanoparticles”, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62:3 (2010), 339–345.
- [60] Oz, M., Lorke, D. E., Petroianu, G. A., “Methylene Blue and Alzheimer’s Disease”, *Biochemical Pharmacology*, 78:8 (2009), 927–932.
- [61] Schirmer, R. H., Adler, H., Pickhardt, M., Mandelkow, E., “Lest we forget you - methylene blue...”, *Neurobiology of Aging*, 32:12 (2011), 2325.e7–2325.e16.
- [62] Tardivo, J. P., Del Giglio, A., de Oliveira, C. S., Gabrielli, D. S., Junqueira, H. C., Tada, D. B., Severino, D., de Fátima Turchiello, R., Baptista, M. S., “Methylene Blue in Photodynamic Therapy: From Basic Mechanisms to Clinical Applications”, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2:3 (2005), 175–191.
- [63] Lo, J. C. Y., Darracq, M. A., Clark, R. F., “A Review of Methylene Blue Treatment for Cardiovascular Collapse”, *The Journal of Emergency Medicine*, 46:5 (2009), 670–679.

- [64] Tang, W., Xu, H., Kopelman, R., Philbert, M. A., "Photodynamic Characterization and In Vitro Application of Methylene Blue-containing Nanoparticle Platforms", *Photochemistry and Photobiology*, 81:2 (2005), 242–249.
- [65] Creaney, B. D. (2013), "Nano-adsorventes para Remoção Magnética de Corantes Orgânicos de Águas". Tese de Mestrado. Universidade de Aveiro, Aveiro.
- [66] Fu, Y., Kao, W. J., "Drug Release Kinetics and Transport Mechanisms of Non-degradable and Degradable Polymeric Delivery Systems", *Expert Opinion on Drug Delivery*, 7:4 (2010), 429–444.
- [67] Siepmann, J., Siepmann, F., "Mathematical Modeling of Drug Delivery", *International Journal of Pharmaceutics*, 364:2 (2008), 328–343.
- [68] Dash, S., Murthy, P. N., Nath, L., Chowdhury, P., "Kinetic Modeling on Drug Release from Controlled Drug Delivery Systems", *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*, 67:3 (2010), 217–223.
- [69] Salgueiro, A. M. M. (2011), "Hidrogéis Nanocompósitos de Ouro para a Libertação de Fármacos". Tese de Mestrado. Universidade de Aveiro, Aveiro.
- [70] Costa, P., Sousa Lobo, J. M., "Modeling and Comparison of Dissolution Profiles", *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 13:2 (2001), 123–133.
- [71] Siepmann, J., Peppas, N. A., "Modeling of Drug Release from Delivery Systems based on Hydroxypropyl Methylcellulose (HPMC)", *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64 (2012), 163–174.
- [72] Lao, L. L., Peppas, N. A., Boey, F. Y. C., Venkatraman, S. S., "Modeling of Drug Release from Bulk-degrading Polymers", *International Journal of Pharmaceutics*, 418:1 (2011), 28–41.
- [73] Rodrigues, S., da Costa, A. M. R., Grenha, A., "Chitosan/Carrageenan Nanoparticles: Effect of Cross-linking with Tripolyphosphate and Charge Ratios", *Carbohydrate Polymers*, 89:1 (2012), 282–289.
- [74] Daniel-da-Silva, A. L., Ferreira, L., Gil, A. M., Trindade, T., "Synthesis and Swelling Behavior of Temperature Responsive  $\kappa$ -carrageenan Nanogels", *Journal of Colloid and Interface Science*, 355:2 (2011), 512–517.
- [75] Daniel-da-Silva, A. L., Moreira, J., Neto, R., Estrada, A. C., Gil, A. M., Trindade, T., "Impact of Magnetic Nanofillers in the Swelling and Release Properties of  $\kappa$ -carrageenan Hydrogel Nanocomposites", *Carbohydrate Polymers*, 87:1 (2012), 328–335.
- [76] Daniel-da-Silva, A. L., Trindade, T., Goodfellow, B. J., Costa, B. F. O., Correia, R. N., Gil, A. M., "In Situ Synthesis of Magnetite Nanoparticles in Carrageenan Gels", *Biomacromolecules*, 8:8 (2007), 2350–2357.
- [77] Malvern Instruments, "Dynamic Light Scattering: An Introduction in 30 Minutes". [Consult. 01 Mar. 2014]. <http://www.malvern.com/en/pdf/secure/TN101104DynamicLightScatteringIntroduction.pdf>
- [78] Sarmento, B., Martins, S., Ribeiro, A., Veiga, F., Neufeld, R., Ferreira, D., "Development and Comparison of Different Nanoparticulate Polyelectrolyte Complexes as Insulin Carriers", *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 12:2 (2006), 131–138.
- [79] Mizrahy, S., Peer, D., "Polysaccharides as Building Blocks for Nanotherapeutics", *Chemical Society Reviews*, 41:7 (2012), 2623–2640.
- [80] Daniel-da-Silva, A. L., Salgueiro, A. M., Trindade, T., "Effects of Au Nanoparticles on Thermoresponsive Genipin-crosslinked Gelatin Hydrogels", *Gold Bulletin*, 46:1 (2013), 25–33.
- [81] Sarmento, B., Ribeiro, A., Veiga, F., Sampaio, P., Neufeld, R., Ferreira, D., "Alginate/Chitosan Nanoparticles are Effective for Oral Insulin Delivery", *Pharmaceutical Research*, 24:12 (2007), 2198–2206.
- [82] Lawrie, G., Keen, I., Drew, B., Chandler-Temple, Rintoul, A., L., Fredericks, P., Grøndahl, L., "Interactions Between Alginate and Chitosan Biopolymers Characterized using FTIR and XPS", *Biomacromolecules*, 8:8 (2007), 2533–2541.

## 7. Anexos

### 1. Microscopia Eletrônica dos nanoprismas de ouro após armazenamento

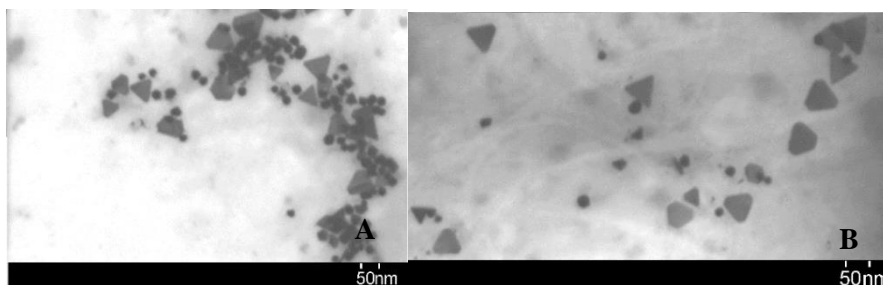


Figura 48 - Imagens de STEM dos nanoprismas de ouro em  $\kappa$ -carragenano com alteração de morfologia.

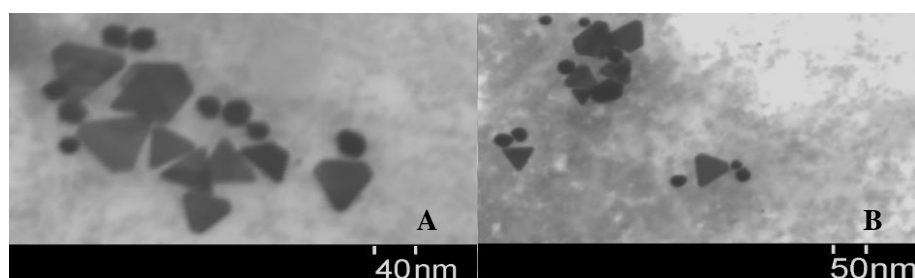


Figura 49 – Imagens de STEM dos nanoprismas de ouro em alginato com alteração de morfologia.

## 2. Ficha DRX do ouro

Status	Alternate	QM:	Indexed	Pressure/Temperature:	Ambient	Chemical Formula:	Au					
Empirical Formula:	Au	Weight %:	Au100.00	Atomic %:	Au100.00	Compound Name:	Gold					
Radiation:	CuK $\alpha$	$\lambda$ :	1.5406Å	d-Spacing:	Calculated	Intensity:	Calculated					
				I/Ic:	25.3							
SYS:	Cubic	SPGR:	Fm-3m (225)									
Author's Cell [	AuthCell a:	4.072Å	AuthCell b:	4.072Å	AuthCell c:	4.072Å	AuthCell MoVol: 16.88 ]					
Density [ Dcalc:	19.377g/cm <sup>3</sup>	Dstruc:	19.37g/cm <sup>3</sup> ]	SS/FOM:	F(9) = 999.9(0.0004, 9)							
Temp:	293.000K	(Author provided temperature)										
Space Group:	Fm-3m (225)	Molecular Weight:	196.97									
Crystal Data [	AuthCell a:	4.072Å	AuthCell b:	4.072Å	AuthCell c:	4.072Å	AuthCell $\beta$ : 90.00°					
AuthCell $\gamma$ :	90.00°	AuthCell Vol:	67.52Å <sup>3</sup>	AuthCell Z:	4.00 ]							
Crystal Data Axial Ratio [	a/b:	1.000	c/b:	1.000 ]								
Reduced Cell [	RedCell a:	2.879Å	RedCell b:	2.879Å	RedCell c:	2.879Å	RedCell $\alpha$ : 60.00°					
RedCell $\beta$ :	60.00°	RedCell $\gamma$ :	60.00°	RedCell Vol:	16.88Å <sup>3</sup> ]							
Crystal (Symmetry Allowed):	Centrosymmetric											
SG Symmetry Operators:												
Seq	Operator	Seq	Operator	Seq	Operator	Seq	Operator					
1	x,y,z	8	-x,-y,-z	15	z,-x,-y	22	-y,x,z					
2	-x,-y,-z	9	y,x,z	16	-z,x,y	23	z,-y,-x					
3	z,x,y	10	-y,-x,-z	17	y,-z,-x	24	-z,y,x					
4	-z,-x,-y	11	z,y,x	18	-y,z,x	25	-x,y,-z					
5	y,z,x	12	-z,-y,-x	19	x,-z,-y	26	x,-y,z					
6	-y,-z,-x	13	x,-y,-z	20	-x,z,y	27	-z,x,-y					
7	x,z,y	14	-x,y,z	21	y,-x,-z	28	z,-x,y					
Atomic Coordinates:												
Atom	Num	Wyckoff	Symmetry	x	y	z	SOE IDP AET					
Au	1			0.0	0.0	0.0	1.0					
Pearson:	cF4.00	Prototype Structure:	Cu	Prototype Structure (Alpha Order):	Cu							
LPF Prototype Structure:	Cu,cF4.225	LPF Prototype Structure (Alpha Order):	Cu,cF4.225									
Subfile(s):	Metals & Alloys, Alternate Pattern, Common Phase, Forensic, NIST Pattern, Inorganic											
Entry Date:	02/11/2005	Last Modification Date:	01/17/2013									
Cross-Ref PDF #'s:	00-001-1172 (Deleted), 00-001-1174 (Deleted), 00-002-1095 (Deleted), 00-004-0784 (Primary), 01-071-4073 (Alternate), 01-071-4614 (Alternate), 01-071-4615 (Alternate), 01-073-9564 (Alternate), 01-075-6560 (Alternate), 01-077-9662 (Alternate), 01-089-3697 (Alternate), 03-065-2870 (Alternate), ✓ 04-001-2616 (Primary), ✓ 04-001-3179 (Alternate), ✓ 04-002-1170 (Alternate), ✓ 04-003-2942 (Alternate), ✓ 04-003-3089 (Alternate), ✓ 04-003-3368 (Alternate), ✓ 04-003-5615 (Alternate), ✓ 04-003-7037 (Alternate), ✓ 04-003-7284 (Alternate), ✓ 04-003-7288 (Alternate), ✓ 04-004-4643 (Alternate), ✓ 04-004-5106 (Alternate), ✓ 04-004-8456 (Alternate), ✓ 04-004-8502 (Alternate), ✓ 04-004-9166 (Alternate), ✓ 04-004-9181 (Alternate), ✓ 04-005-1700 (Alternate), ✓ 04-005-6759 (Alternate), ✓ 04-006-2588 (Alternate), ✓ 04-007-8000 (Alternate), ✓ 04-011-7355 (Alternate), ✓ 04-014-0267 (Alternate), ✓ 04-015-6084 (Alternate), ✓ 04-016-6157 (Alternate)											
References:												
Type	DOI	Reference										
Primary Reference		Calculated from NIST using POWD-12++.										
Structure		"High-temperature thermal expansion of six metallic elements measured by dilatation method and X-ray diffraction". Suh, I.-K., Ohta, H., Waseda, Y. J. Mater. Sci. 23, 757 (1988).										
Database Comments:	NIST M&A collection code: A 7123 53929 15. Temperature Factor: TF TF was not given, B set to 1.000 for calc. Temperature of Data Collection: 293 K. Minor Warning: No e.s.d reported/abstracted on the cell dimension. No Rfactor reported/abstracted. Unit Cell Data Source: Powder Diffraction.											
d-Spacings (9) - 03-065-8601 (Fixed Slit Intensity) - Cu K $\alpha$ 1.54056Å												
2 $\theta$	d(Å)	I	h	k	l	*						
38.2516	2.350970	999	1	1	1							
44.4606	2.036000	461	2	0	0							
64.6932	1.439670	238	2	2	0							
77.7159	1.227750	243	3	1	1							
81.8824	1.175490	67	2	2	2							
98.3413	1.018000	29	4	0	0							
111.0860	0.934181	88	3	3	1							
115.5524	0.910527	83	4	2	0							
135.8568	0.831194	71	4	2	2							

### 3. Morfologia e Carga Superficial

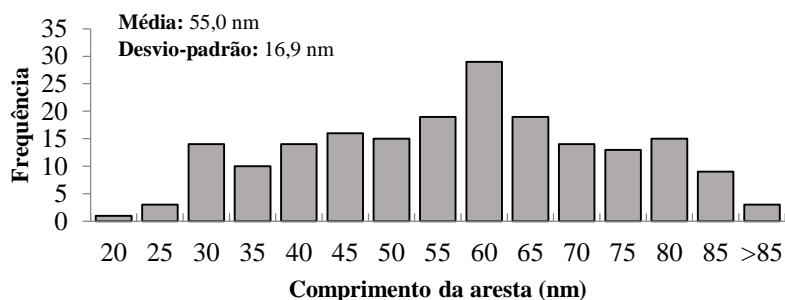


Figura 50 - Histograma da distribuição de comprimentos das arestas dos nanoprismas de ouro em  $\kappa$ -carragenano.

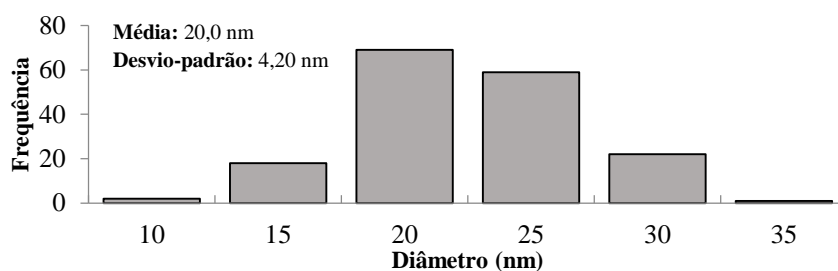


Figura 51 - Histograma da distribuição de diâmetros das nanoesferas de ouro em  $\kappa$ -carragenano.

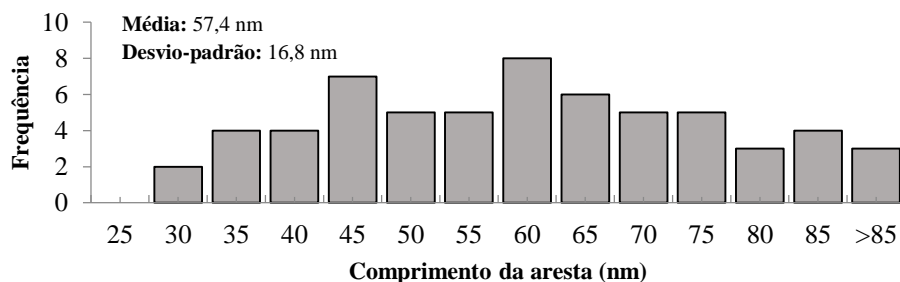


Figura 52 - Histograma da distribuição de comprimentos das arestas dos nanoprismas de ouro em alginato.

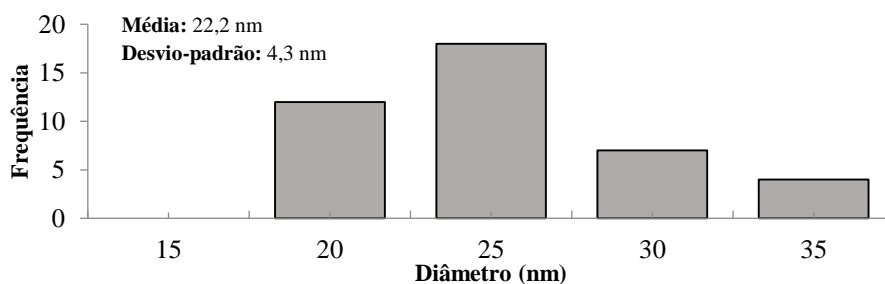


Figura 53 – Histograma da distribuição dos diâmetros das nanopartículas esféricas de ouro em alginato.

Tabela 11 – Potencial zeta e diâmetro hidrodinâmico das soluções usadas nas sínteses de AuNPs.

Solução	pH	T (°C)	$\zeta$ (mV)	d (nm)	Z-Average (nm)	PDI
Aquosa de $\kappa$ -CRG de 5 mg/mL	6,8	25	-70,7 $\pm$ 3,2	1322 $\pm$ 70	4029 $\pm$ 331	0,38 $\pm$ 0,13
Aquosa de ALG de 5 mg/mL	7,5	25	-68,1 $\pm$ 3,1	1259 $\pm$ 181	1382 $\pm$ 33	0,19 $\pm$ 0,03

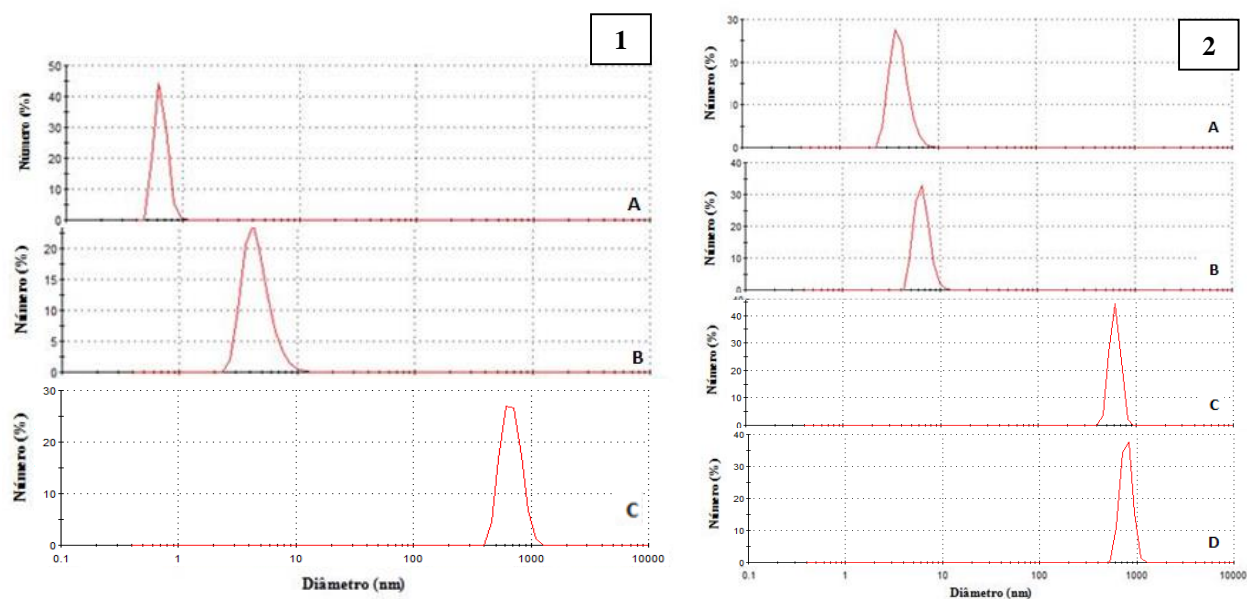


Figura 54 – 1) Distribuição do diâmetro hidrodinâmico obtido por DLS da solução de 0,5 mg/mL de  $\kappa$ -CRG (A), da solução de 1 mg/mL de QUT em ácido acético a 1% (v/v) (B) e do nanogel de  $\kappa$ -CRG/QUT (C); 2) Distribuição do diâmetro hidrodinâmico obtido por DLS da solução de 0,063 % (m/m) de ALG (A), da solução aquosa de 0,70 mg/mL de QUT (B), do nanogel de ALG/QUT (C) e do nanogel de ALG/QUT com AuNPs (D).

Tabela 12 - Potencial zeta e diâmetro hidrodinâmico das soluções usadas nas sínteses de nanogéis de  $\kappa$ -CRG/QUT e ALG/QUT.

Solução	pH	T (°C)	$\zeta$ (mV)	d (nm)	Z-Average (nm)	PDI
Aquosa de $\kappa$ -CRG de 0,5 mg/mL	6,2	22	-54,5 $\pm$ 6,8	0,70 $\pm$ 0,07	1191 $\pm$ 1	0,85 $\pm$ 0,13
QUT de 1 mg/mL em ácido acético 1% (v/v)	3,0	22	+55,4 $\pm$ 4,3	2,43 $\pm$ 0,19	40,1 $\pm$ 6,8	1,0 $\pm$ 0,0
Aquosa de ALG de 0,063% (m/m)	6,3	19	-30,5 $\pm$ 9,8	2,37 $\pm$ 2,38	791 $\pm$ 97	0,64 $\pm$ 0,08
Aquosa de QUT de 0,7mg/mL	5,0	19	+61,7 $\pm$ 3,4	6,86 $\pm$ 0,40	1218 $\pm$ 51	0,45 $\pm$ 0,06

#### 4. Avaliação do Efeito Fototérmico

Tabela 13 – Resultados obtidos para a água UP.

Amostra	t (min)	T (°C)
Água UP	0	24,7
	5	24,9
	10	24,9
	15	25
	20	25,2
	25	25,3
	30	25,5

Tabela 14 – Resultados obtidos das amostras de AuNPs estabilizadas em  $\kappa$ -carragenano.

Amostra	t (min)	T (°C)	Amostra	t (min)	T (°C)	Amostra	t (min)	T (°C)	Amostra	t (min)	T (°C)
140 µg/mL	0	24,7	70 µg/mL	0	24,7	35 µg/mL	0	24,7	14 µg/mL	0	24,7
	0,25	25,5		0,25	25,9		0,25	25,7		0,25	25,7
	0,5	26,6		0,5	26,8		0,5	26,3		0,5	25,9
	0,75	26,9		0,75	27,7		0,75	28		0,75	26,2
	1	27,2		1			1	28,2		1	26,5
	1,25	27,7		1,25			1,25	28,4		1,25	27
	1,5	28		1,5			1,5	28,7		1,5	27,2
	1,75	28,3		1,75			1,75	28,9		1,75	27,3
	2	28,7		2	28,6		2	29		2	27,5
	2,25	28,8		2,25			2,25	29,2		3	28
	2,5	29,1		2,5			2,5	29,5		4	28,3
	2,75	29,4		2,75	29,2		2,75	29,6		5	28,6
	3	29,6		3	29,4		3	29,7		10	29,1
	3,25	29,8		3,25	29,5		3,25	29,8		15	29,5
	3,5	30		3,5	29,6		3,5	29,8		20	29,5
	3,75	30,1		3,75	29,8		3,75	29,9		25	29,7
	4	30,2		4	30		4	30,1		30	29,7
	4,25	30,4		4,25	30		4,25	30,2			
	4,5	30,6		4,5	30,1		4,5	30,2			
	4,75	30,7		4,75	30,1		4,75	30,2			
	5	30,8		5	30,2		5	30,3			
	6	31,2		6	30,4		6	30,7			
	7	31,6		7	30,7		7	30,8			
	8	31,7		8	30,9		8	30,9			
	9	32,1		9	31		9	30,9			
	10	32,2		10	31,2		10	31			
	15	32,8		15	31,5		15	31,3			
	20	33,3		20	31,9		20	31,4			
	25	33,9		25	32,2		25	31,7			
	30	34,1		30	32,7		30	31,8			

Tabela 15 – Resumo dos resultados obtidos das amostras de AuNPs estabilizadas em  $\kappa$ -carragenano.

Amostra	T <sub>5min</sub> (°C)	$\Delta T_{5min}$ (°C)	T <sub>30min</sub> (°C)	$\Delta T_{30min}$ (°C)
140 $\mu\text{g/mL}$	30,8	6,1	34,1	9,4
70 $\mu\text{g/mL}$	30,2	5,5	32,7	8
35 $\mu\text{g/mL}$	30,3	5,6	31,8	7,1
14 $\mu\text{g/mL}$	28,6	3,9	29,7	5
Água UP	24,9	0,2	25,5	0,8

Tabela 16 - Resultados obtidos das amostras de AuNPs estabilizadas em alginato.

Amostra	t (min)	T (°C)	Amostra	t (min)	T (°C)	Amostra	t (min)	T (°C)	Amostra	t (min)	T (°C)
140 $\mu\text{g/mL}$	0	24,7	70 $\mu\text{g/mL}$	0	24,7	35 $\mu\text{g/mL}$	0	24,7	14 $\mu\text{g/mL}$	0	24,7
	0,25	25,6		0,5	26,6		0,5	26,2		0,25	25,5
	0,5	26,4		0,75	28		0,75	26,7		0,5	26,1
	0,75	27		1	28,3		1	27,3		0,75	26,3
	1	27,5		1,5	28,6		2	27,8		1	26,4
	1,25	28		1,75	29,2		3	28,2		1,25	26,4
	1,5	28,5		2	29,5		4	28,4		1,5	26,5
	1,75	28,9		2,25	29,7		5	28,6		1,75	26,6
	2	29,3		2,5	30		6	28,8		2	26,7
	2,5	30		2,75	30,2		7	29		2,5	26,7
	3	30,7		3	30,4		8	29,3		3	26,8
	4	31,7		3,25	30,6		9	29,3		4	27,1
	5	32,5		3,5	30,8		10	29,4		5	27,2
	6	33,1		3,75	31		11	29,4		10	27,4
	7	33,7		4	31,1		12	29,6		15	28,2
	8	34,1		4,25	31,3		13	29,7		20	28,6
	9	34,5		4,5	31,5		14	29,8		25	28,8
	10	34,8		4,75	31,6		15	29,8		30	29
	11	35		5	31,7		16	29,9			
	12	35,2		5,25	31,8		17	30			
	13	35,5		5,5	32		18	30,1			
	14	35,7		5,75	32,1		19	30,2			
	15	35,8		6	32,2		20	30,2			
	16	35,9		6,25	32,3		21	30,2			
	17	35,9		6,5	32,3		22	30,3			
	18	36		6,75	32,4		23	30,3			
	19	36,1		7	32,5		24	30,4			
	20	36,1		8	32,6		25	30,4			
	21	36,3		9	32,7		26	30,5			
	22	36,4		10	32,9		27	30,5			
	23	36,5		11	33,1		28	30,6			
	24	36,5		12	33,1		29	30,7			
	25	36,6		13	33,2		30	30,8			
	26	36,6		14	33,2						



27	36,7	15	33,2		
28	36,8	16	33,4		
29	36,8	17	33,4		
30	36,8	18	33,5		
		19	33,5		
		20	33,6		
		21	33,6		
		22	33,7		
		23	33,6		
		24	33,7		
		25	33,7		
		26	33,6		
		27	33,7		
		28	33,7		
		29	33,7		
		30	33,7		

Tabela 17 – Resumo dos resultados obtidos das amostras de AuNPs estabilizadas em alginato.

Amostra	T <sub>5min</sub> (°C)	ΔT <sub>5min</sub> (°C)	T <sub>final</sub> (°C)	ΔT <sub>final</sub> (°C)
140 µg/mL	32,5	7,8	36,8	12,1
70 µg/mL	31,7	7	33,7	9
35 µg/mL	28,6	3,9	30,8	6,1
14 µg/mL	27,2	2,5	29	4,3
Água UP	24,9	0,2	25,5	0,8

## 5. Reta de Calibração do Azul-de-metileno

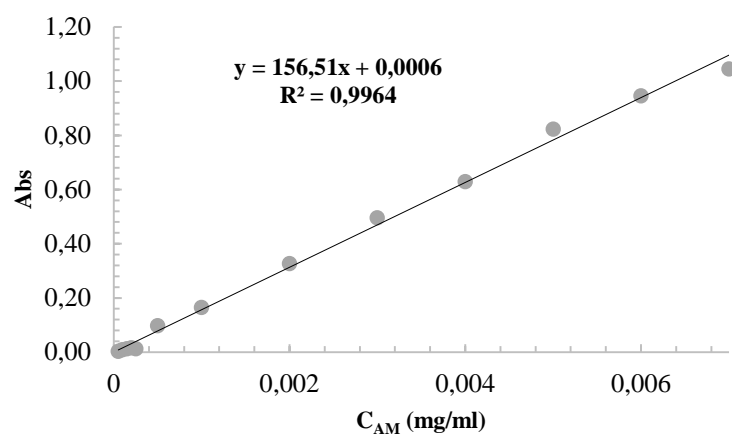


Figura 55 - Reta de calibração usada nos ensaios de encapsulação de AM.

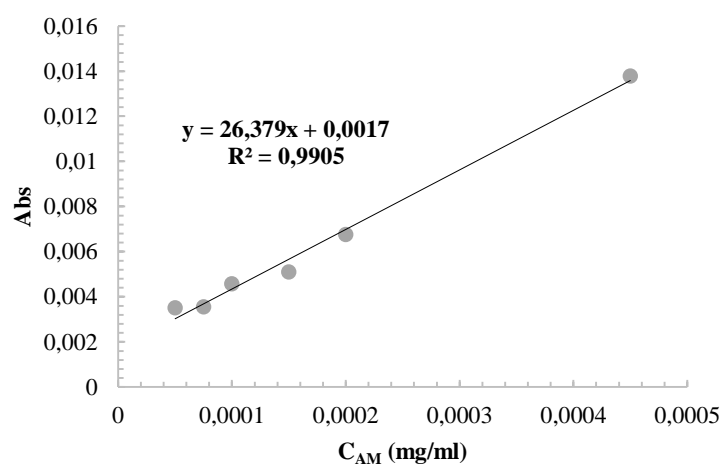


Figura 56 - Reta de calibração usada nos ensaios de liberação de AM.

## 6. Ensaios de Encapsulação

Tabela 18 – Resultados obtidos nos ensaios de encapsulação de AM prévios aos ensaios de liberação.

	MDI (mg)	MDN (mg)	MN (mg)	EE (%)	CE (%)
Nanogel	0,0140±0	0,0058±0,0009	0,1615±0,0290	41,47±6,35	3,70±0,69
Nanogel Compósito @ 2,30%(m/m) AuNPs	0,0140±0	0,0047±0,0007	0,1615±0,0290	33,69±4,98	2,91±0,43
Nanogel Compósito @ 2,93%(m/m) AuNPs	0,0140±0	0,0064±0,0004	0,1615±0,0290	45,53±1,52	3,93±0,13
Nanogel Compósito @ 3,73%(m/m) AuNPs	0,0140±0	0,0061±0,0002	0,1615±0,0290	43,99±1,58	3,80±0,14

## 7. Ensaios de Liberação

Tabela 19 – Resultados da liberação de AM dos nanogéis sem AuNPs no ensaio sem exposição a radiação com temperatura constante de 37°C.

t (min)	m <sub>t</sub> /m <sub>0</sub>	m <sub>t</sub> /m <sub>0</sub>	DP	m <sub>t</sub> /m <sub>0</sub> média	%Libertação	%Libertação	DP %	%Libertação média
0	0,0501	0,0635	0,0095	0,0568	5,015	6,353	0,9460	5,684
30	0,0767	0,0771	0,0003	0,0769	7,672	7,711	0,0277	7,692
60	0,0781	0,0774	0,0005	0,0778	7,811	7,740	0,0505	7,775
90	0,0718	0,0844	0,0089	0,0781	7,178	8,439	0,8919	7,808
120	0,0718	0,0854	0,0096	0,0786	7,180	8,536	0,9587	7,858
180	0,0814	0,0842	0,0020	0,0828	8,144	8,420	0,1955	8,282
240	0,0862	0,0842	0,0014	0,0852	8,620	8,419	0,1419	8,519
300	0,0791	0,0836	0,0032	0,0814	7,908	8,364	0,3228	8,136
360	0,0854	0,0798	0,0039	0,0826	8,537	7,981	0,3930	8,259
420	0,0795	0,0863	0,0047	0,0829	7,954	8,625	0,4747	8,289
480	0,0838	0,0827	0,0008	0,0832	8,376	8,266	0,0779	8,321
1680	0,0785	0,0869	0,0060	0,0827	7,847	8,692	0,5970	8,269

Tabela 20 - Resultados da liberação de AM dos nanogéis com AuNPs no ensaio sem exposição a radiação com temperatura constante de 37°C.

t (min)	m <sub>t</sub> /m <sub>0</sub>	m <sub>t</sub> /m <sub>0</sub>	DP	m <sub>t</sub> /m <sub>0</sub> média	%Libertação	%Libertação	DP %	%Libertação média
0	0,0572	0,0822	0,0177	0,0697	5,720	8,217	1,766	6,968
30	0,0675	0,1024	0,0247	0,0850	6,754	10,24	2,467	8,498
60	0,0728	0,0984	0,0181	0,0856	7,276	9,836	1,810	8,556
90	0,0775	0,0961	0,0132	0,0868	7,750	9,613	1,317	8,682
120	0,0808	0,0976	0,0119	0,0892	8,083	9,764	1,189	8,923
180	0,0799	0,1005	0,0146	0,0902	7,989	10,05	1,461	9,022
240	0,0803	0,1000	0,0139	0,0901	8,026	9,997	1,394	9,011
300	0,0833	0,1011	0,0126	0,0922	8,327	10,11	1,258	9,217
360	0,0924	0,1035	0,0079	0,0979	9,239	10,35	0,786	9,795
420	0,0928	0,1038	0,0078	0,0983	9,276	10,38	0,777	9,826
480	0,0966	0,1034	0,0048	0,1000	9,665	10,34	0,481	10,00
1680	0,0914	0,1009	0,0068	0,0962	9,137	10,09	0,677	9,615

**Tabela 21 - Resultados da libertação de AM dos nanogéis no ensaio com exposição a radiação.**

t (min)	m <sub>t</sub> /m <sub>0</sub>	m <sub>t</sub> /m <sub>0</sub>	DP	m <sub>t</sub> /m <sub>0</sub> média	%Libertação	%Libertação	DP %	%Libertação média
<b>Nanogel</b>								
0	0,0240	0,0239	0,0001	0,0240	2,403	2,390	0,0090	2,396
15	0,0510	0,0507	0,0002	0,0509	5,101	5,073	0,0191	5,087
30	0,0891	0,0886	0,0003	0,0888	8,906	8,859	0,0334	8,883
45	0,1279	0,1272	0,0005	0,1275	12,79	12,72	0,0479	12,75
60	0,2006	0,1995	0,0008	0,2000	20,06	19,95	0,0751	20,00
<b>Nanogel Compósito 1</b>								
0	0,0666	0,0819	0,0108	0,0742	6,660	8,190	1,082	7,425
15	0,1187	0,1442	0,0181	0,1314	11,87	14,42	1,806	13,14
30	0,1681	0,2124	0,0313	0,1902	16,81	21,24	3,127	19,02
45	0,2334	0,3007	0,0476	0,2670	23,34	30,07	4,757	26,70
60	0,2849	0,3640	0,0559	0,3245	28,49	36,40	5,592	32,45
<b>Nanogel Compósito 2</b>								
0	0,0975	0,1120	0,0102	0,1047	9,751	11,20	1,022	10,47
15	0,1752	0,2015	0,0186	0,1884	17,52	20,15	1,857	18,84
30	0,3136	0,2952	0,0130	0,3044	31,36	29,52	1,300	30,44
45	0,3826	0,3888	0,0044	0,3857	38,26	38,88	0,4395	38,57
60	0,4507	0,4590	0,0059	0,4549	45,07	45,90	0,5873	45,49

**Tabela 22 - Resultados da libertação de AM dos nanogéis compósitos 2 no ensaio sem exposição a radiação e a temperatura ambiente.**

t (min)	m <sub>t</sub> /m <sub>0</sub>	m <sub>t</sub> /m <sub>0</sub>	DP	m <sub>t</sub> /m <sub>0</sub> média	%Libertação	%Libertação	DP %	%Libertação média
0	0,0643	0,0432	0,0149	0,0537	6,431	4,3187	1,494	5,375
15	0,1256	0,0888	0,0261	0,1072	12,56	8,8751	2,607	10,72
30	0,2112	0,1325	0,0556	0,1718	21,12	13,2522	5,561	17,18
45	0,2638	0,1961	0,0479	0,2300	26,38	19,61	4,796	23,00
60	0,3371	0,2425	0,0669	0,2898	33,71	24,25	6,689	28,98

## 8. Modelação da Cinética de Libertação

### 1. Ensaios sem radiação @37°C

Tabela 23 – Modelação cinética dos dados de libertação de AM dos nanogéis  $\kappa$ -CRG/QUT sem efeito de radiação.

	Ordem 0	Ordem 1	Korsmeyer-Peppas		Higuchi	
t (min)	$\frac{m_t}{m_{0\text{médio}}}$	$\ln\left(\frac{m_t}{m_{0\text{médio}}}\right)$	$\ln(t)$	$\ln\left(\frac{m_t}{m_{0\text{médio}}}\right)$	$t^{0,5} (min^{0,5})$	$\frac{m_t}{m_{0\text{médio}}}$
0	0,0568	-2,868	-16,12	-2,868	0,0003	0,0568
30	0,0769	-2,565	3,401	-2,565	5,477	0,0769
60	0,0778	-2,554	4,094	-2,554	7,746	0,0778
90	0,0781	-2,550	4,500	-2,550	9,487	0,0781
120	0,0786	-2,544	4,788	-2,544	10,95	0,0786
180	0,0828	-2,491	5,193	-2,491	13,42	0,0828
240	0,0853	-2,463	5,481	-2,463	15,49	0,0852
300	0,0814	-2,509	5,704	-2,509	17,32	0,0814
360	0,0826	-2,494	5,886	-2,494	18,97	0,0826
420	0,0829	-2,490	6,040	-2,490	20,49	0,0829
480	0,0832	-2,486	6,174	-2,486	21,91	0,0832

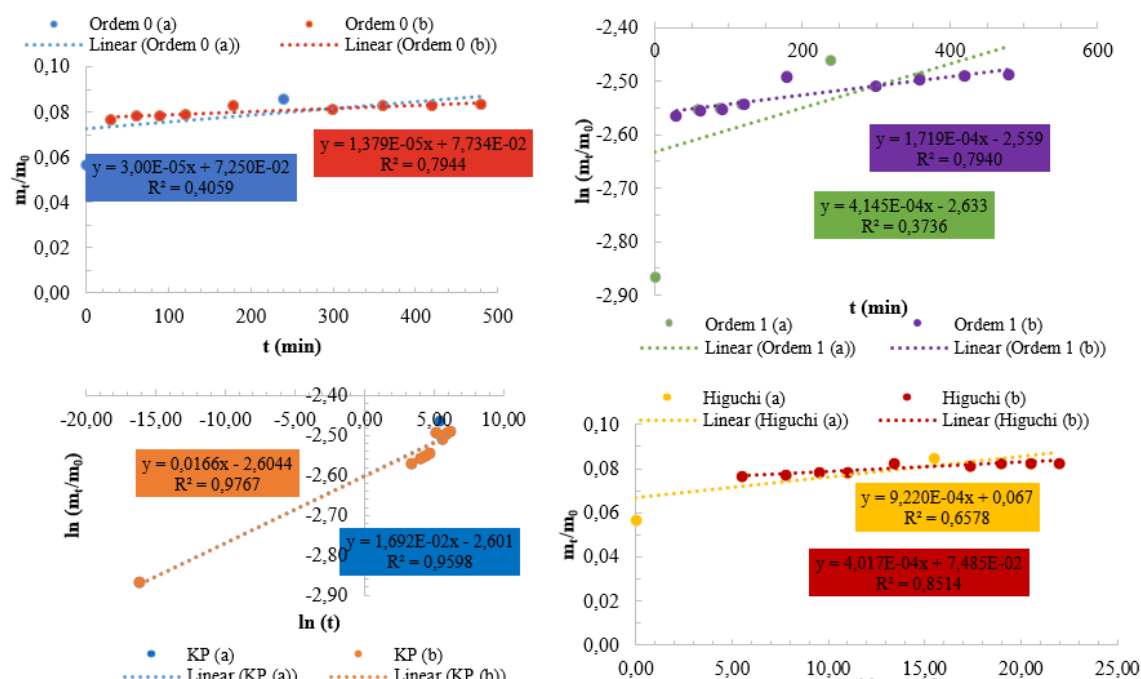
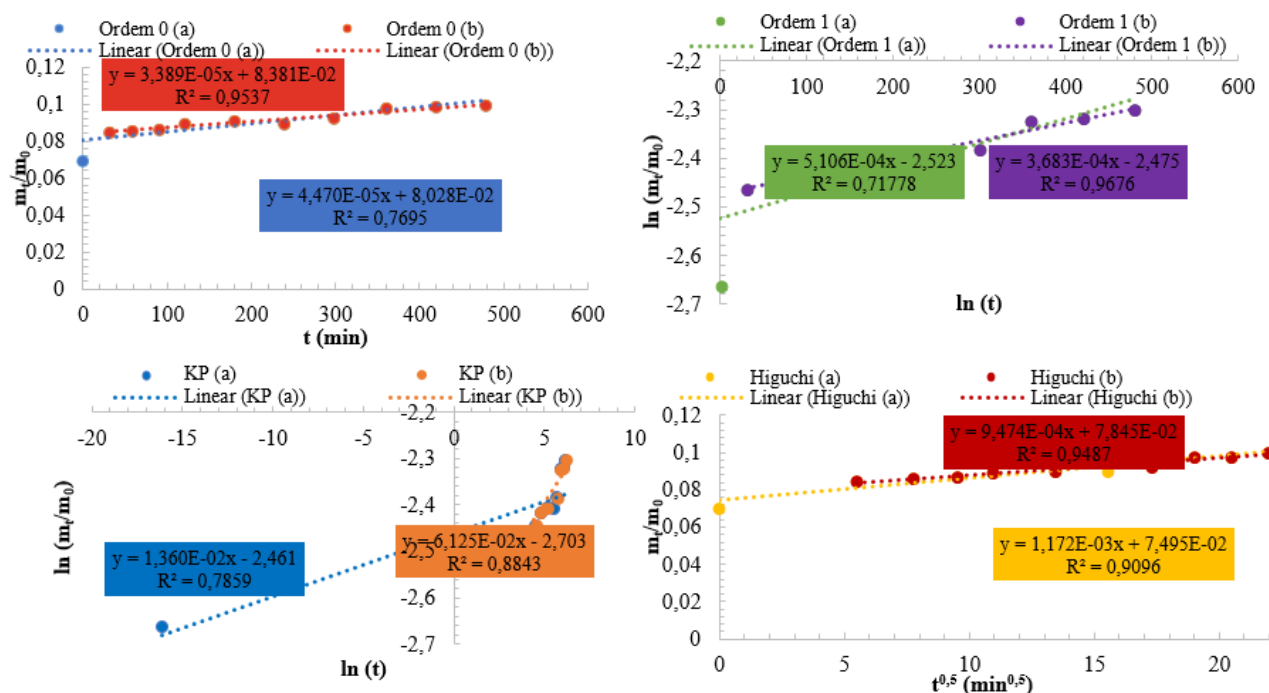


Figura 57 – Representações dos ajustes dos dados experimentais de libertação dos nanogéis  $\kappa$ -CRG/QUT sem exposição a radiação a 37°C. Onde em (a) foram utilizados todos os pontos experimentais e em (b) se excluíram os pontos  $t = 0$  e 240 min.

**Tabela 24 – Modelação cinética dos dados de libertação de AM dos nanogéis de  $\kappa$ -CRG/QUT/Au sem efeito de radiação.**

	Ordem 0	Ordem 1	Korsmeyer-Peppas		Higuchi	
t (min)	$\frac{m_t}{m_{0\text{médio}}}$	$\ln\left(\frac{m_t}{m_{0\text{médio}}}\right)$	$\ln(t)$	$\ln\left(\frac{m_t}{m_{0\text{médio}}}\right)$	$t^{0,5} (\text{min}^{0,5})$	$\frac{m_t}{m_{0\text{médio}}}$
0	0,0697	-2,664	-16,12	-2,664	0,0003	0,0697
30	0,0850	-2,465	3,401	-2,465	5,477	0,0850
60	0,0856	-2,459	4,094	-2,459	7,746	0,0856
90	0,0868	-2,444	4,500	-2,444	9,487	0,0868
120	0,0892	-2,417	4,787	-2,417	10,95	0,0892
180	0,0902	-2,406	5,193	-2,406	13,42	0,0902
240	0,0901	-2,407	5,481	-2,407	15,49	0,0901
300	0,0922	-2,384	5,704	-2,384	17,32	0,0922
360	0,0979	-2,323	5,886	-2,323	18,97	0,0979
420	0,0983	-2,320	6,040	-2,320	20,49	0,0983
480	0,1000	-2,302	6,174	-2,302	21,91	0,1000



**Figura 58 - Representações gráficas dos ajustes dos dados experimentais de libertação dos nanogéis com AuNPs sem exposição a radiação a 37°C. Onde em (a) foram utilizados todos os pontos experimentais e em (b) se excluíram os pontos  $t = 0$  e 240 min.**

## 2. Ensaios com radiação

Tabela 25 – Modelação cinética dos dados de libertação de AM dos nanogéis com efeito de radiação.

	Ordem 0	Ordem 1	Korsmeyer-Peppas		Higuchi	
t (min)	$\frac{m_t}{m_{0\text{médio}}}$	$\ln\left(\frac{m_t}{m_{0\text{médio}}}\right)$	$\ln(t)$	$\ln\left(\frac{m_t}{m_{0\text{médio}}}\right)$	$t^{0,5} (\text{min}^{0,5})$	$\frac{m_t}{m_{0\text{médio}}}$
<b>Nanogel</b>						
0	0,0240	-3,731	-16,12	-3,731	0,0003	0,0240
15	0,0509	-2,979	2,708	-2,979	3,873	0,0509
30	0,0888	-2,421	3,401	-2,421	5,477	0,0888
45	0,1275	-2,060	3,807	-2,060	6,708	0,1275
60	0,2000	-1,609	4,094	-1,609	7,746	0,2000
<b>Nanogel Compósito 1</b>						
0	0,0742	-2,600	-16,12	-2,600	0,0003	0,0742
15	0,1314	-2,029	2,708	-2,029	3,873	0,1314
30	0,1902	-1,659	3,401	-1,659	5,477	0,1902
45	0,2670	-1,320	3,807	-1,320	6,708	0,2670
60	0,3245	-1,126	4,094	-1,126	7,746	0,3245
<b>Nanogel Compósito 2</b>						
0	0,1047	-2,2563	-16,12	-2,256	0,0003	0,1047
15	0,1884	-1,6694	2,708	-1,669	3,873	0,1884
30	0,3044	-1,1894	3,401	-1,1894	5,477	0,3044
45	0,3857	-0,9526	3,807	-0,9526	6,708	0,3857
60	0,4549	-0,7877	4,094	-0,7877	7,746	0,4549

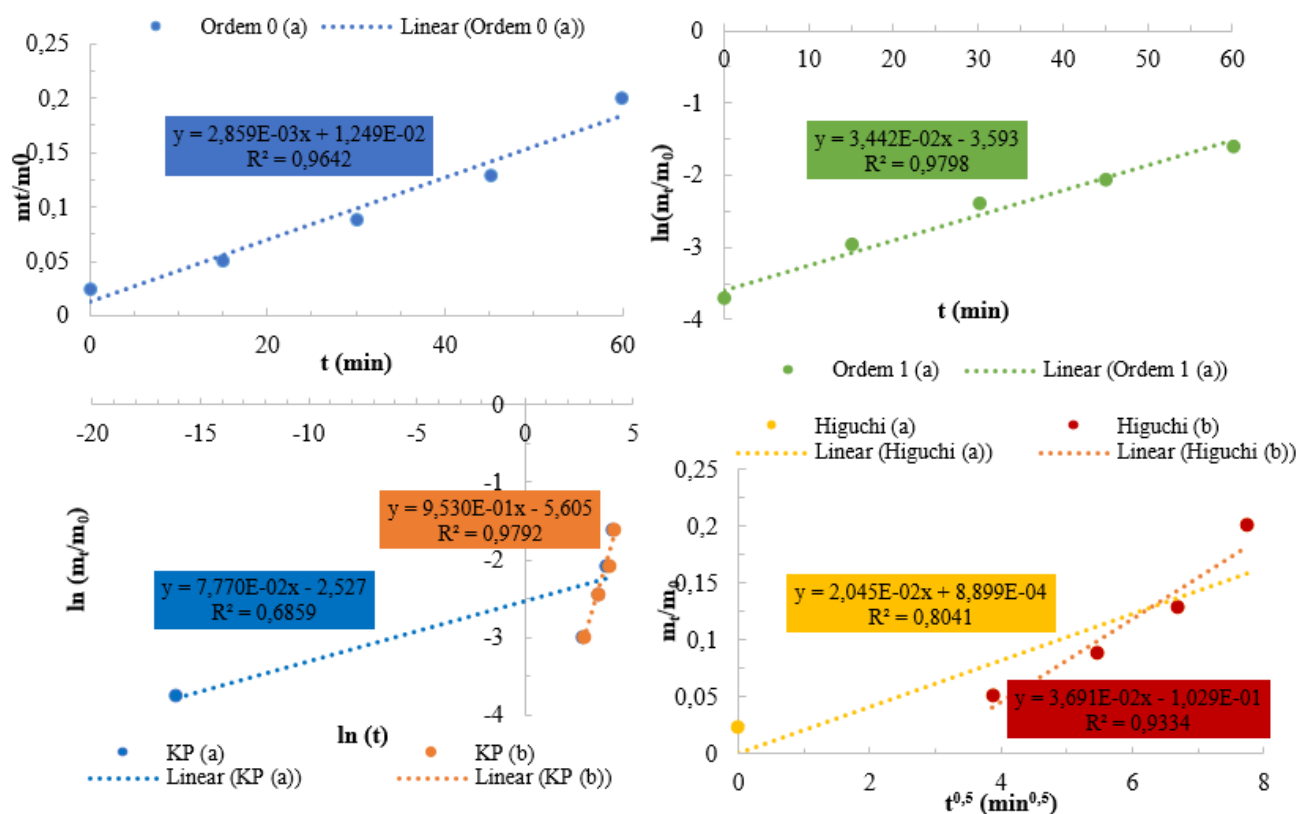


Figura 59 - Representações gráficas dos ajustes dos dados experimentais de libertação dos nanogéis sem AuNPs com exposição a radiação. Onde em (a) foram utilizados todos os pontos experimentais e em (b) se excluiu o ponto  $t = 0$  min.

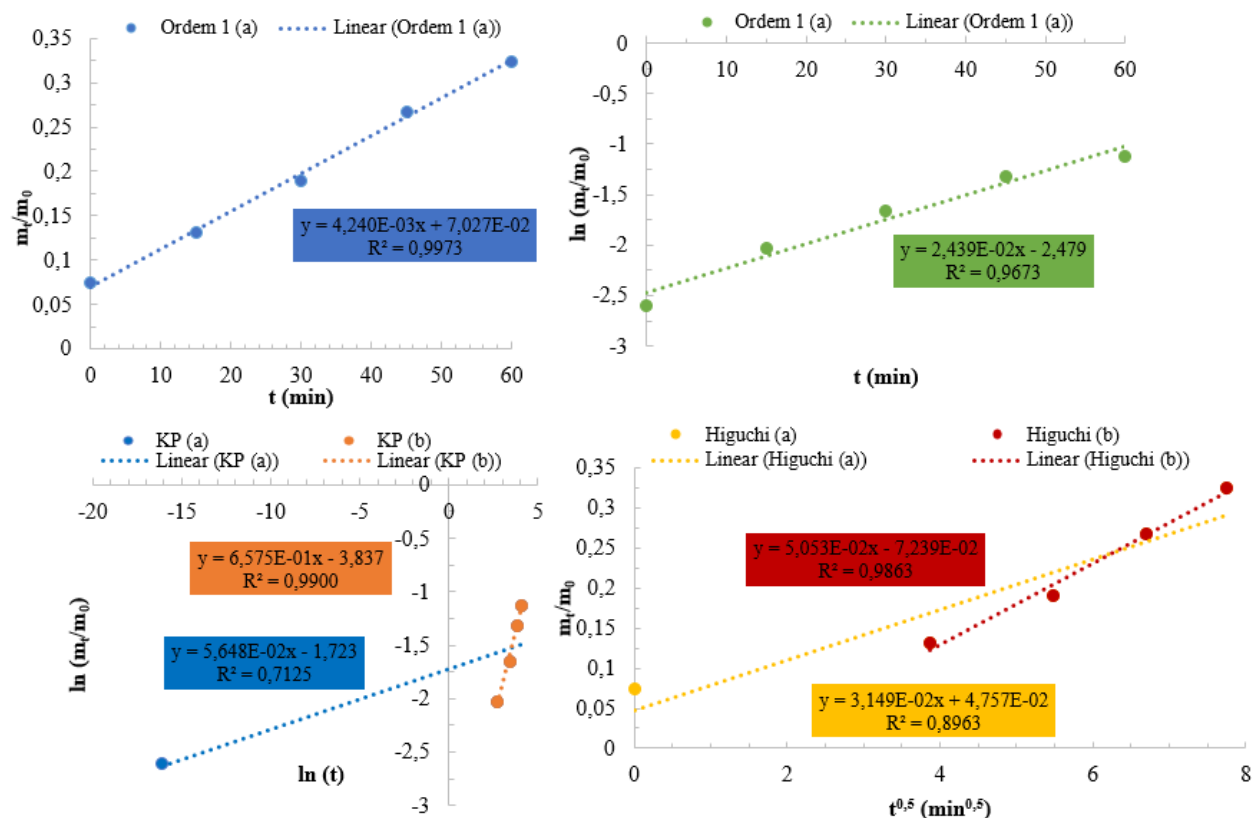


Figura 60 - Representações gráficas dos ajustes dos dados experimentais de libertação dos nanogéis compostos 1 com exposição a radiação. Onde em (a) foram utilizados todos os pontos experimentais e em (b) se excluíram os pontos  $t = 0$  e  $240$  min.



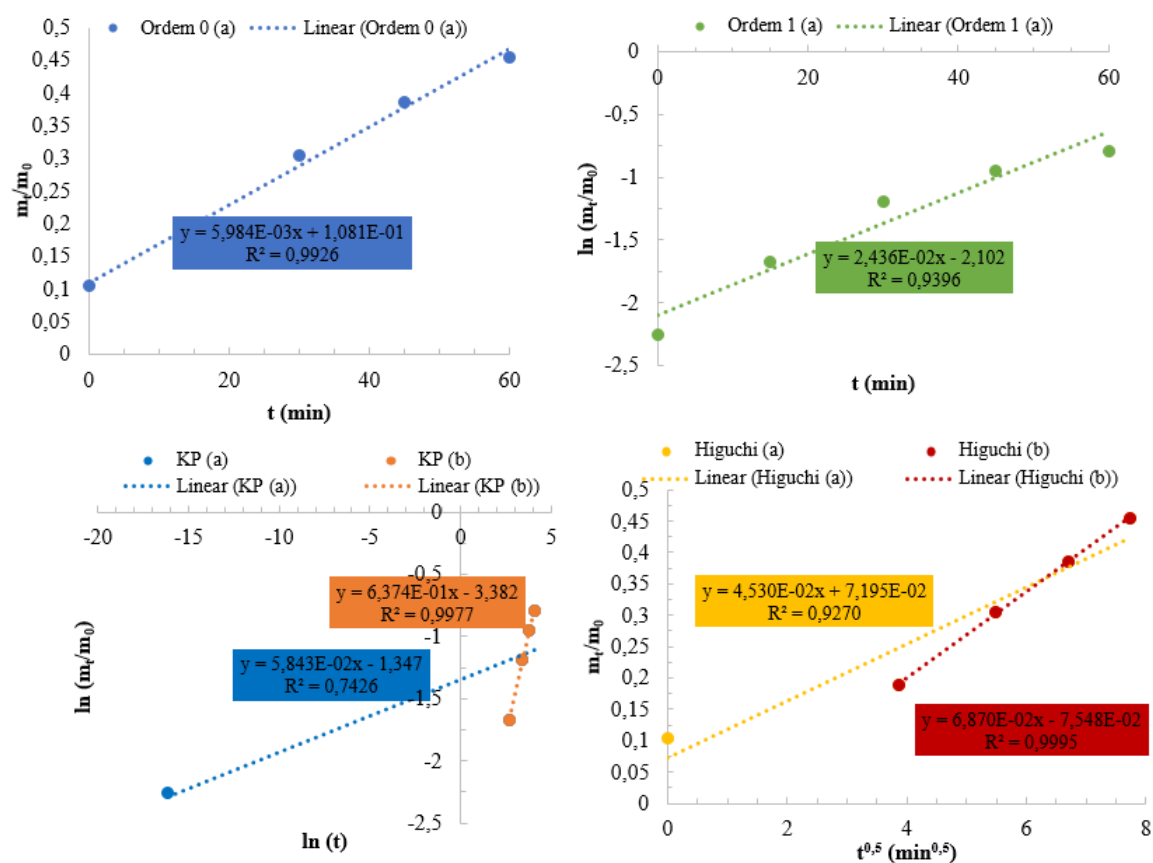


Figura 61 - Representações gráficas dos ajustes dos dados experimentais de liberação dos nanogéis compósitos 2 com exposição a radiação. Onde em (a) foram utilizados todos os pontos experimentais e em (b) se excluiu o ponto  $t = 0$  min.

Tabela 26 – Modelação cinética dos dados de liberação de AM dos nanogéis de  $\kappa$ -CRG/QUT/Au2 sem efeito de radiação a temperatura ambiente.

	Ordem 0	Ordem 1	Korsmeyer-Peppas		Higuchi	
t (min)	$\frac{m_t}{m_{0_{\text{médio}}}}$	$\ln\left(\frac{m_t}{m_{0_{\text{médio}}}}\right)$	$\ln(t)$	$\ln\left(\frac{m_t}{m_{0_{\text{médio}}}}\right)$	$t^{0,5} (\text{min}^{0,5})$	$\frac{m_t}{m_{0_{\text{médio}}}}$
0	0,0537	-2,925	-16,12	-2,925	0,0000	0,0537
15	0,1070	-2,235	2,708	-2,235	3,873	0,1070
30	0,1716	-1,763	3,401	-1,763	5,477	0,1716
45	0,2296	-1,472	3,807	-1,472	6,708	0,2296
60	0,2893	-1,240	4,094	-1,240	7,746	0,2893

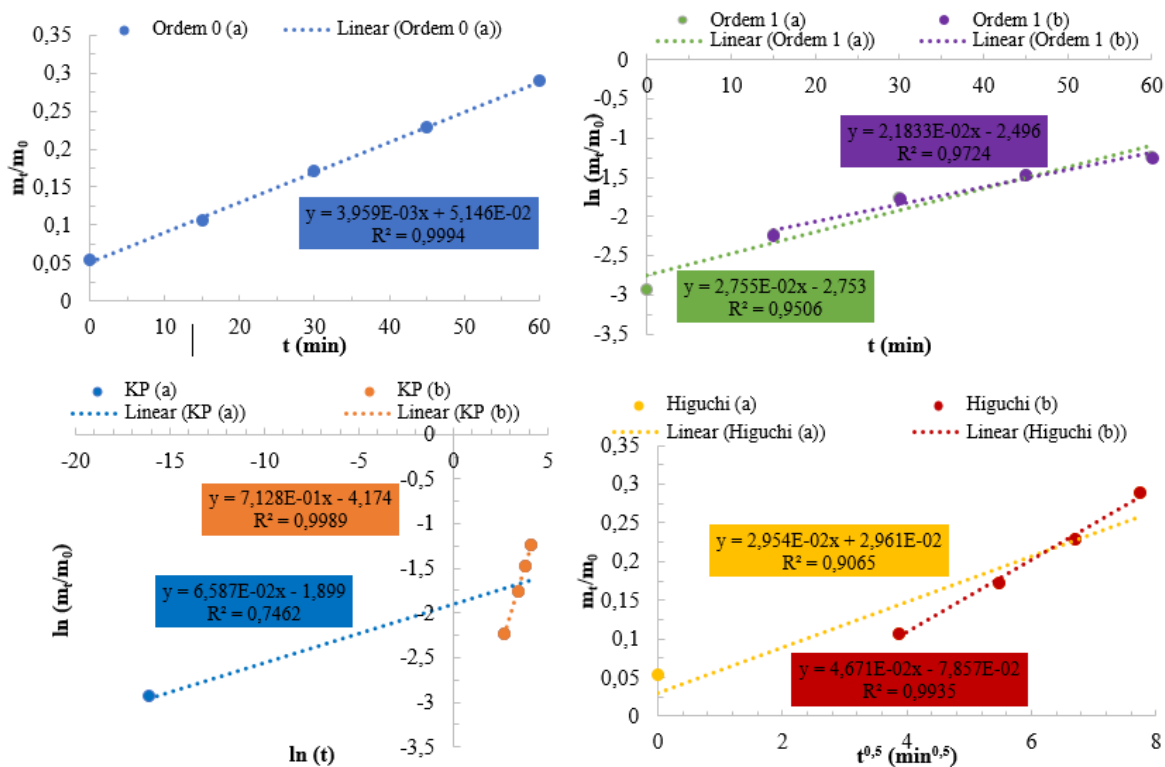


Figura 62 - Representações gráficas dos ajustes dos dados experimentais de libertação dos nanogéis compósitos 2 a temperatura ambiente. Onde em (a) foram utilizados todos os pontos experimentais e em (b) se excluiu o ponto  $t = 0$  min.